

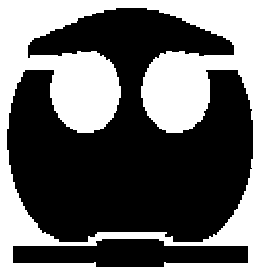
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE *Alnus
acuminata* subsp. *Arguta* (Schlecht.) Furlow

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
OSCAR ILLESCAS POMPOSO



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

| | |
|--------------------------|--|
| Presidente | <i>Prof. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS</i> |
| Vocal | <i>Prof. RACHEL MATA ESSAYAG</i> |
| Secretario | <i>Prof. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ</i> |
| 1 ^{er} Suplente | <i>Prof. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ</i> |
| 2 ^o Suplente | <i>Prof. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR</i> |

Sitio de realización de la tesis:

Laboratorio 125 del Departamento de Farmacia, conjunto "E", División de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, Ciudad Universitaria

ASESOR:

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

SUSTENTANTE:

Oscar Illescas Pomposo



ÍNDICE

| | |
|--|------|
| Lista de abreviaturas | V |
| Lista de figuras | VII |
| Lista de espectros | VIII |
| Lista de tablas | .IX |
| | |
| 1 . INTRODUCCIÓN | 1 |
| | |
| 2 . ANTECEDENTES | 2 |
| | |
| 2.1 FAMILIA BETULACEAE | 2 |
| | |
| 2.2 GÉNERO <i>ALNUS</i> | 2 |
| 2.2.1 Composición química | 2 |
| 2.2.2 Actividad biológica | 7 |
| | |
| 2.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE <i>Alnus acuminata</i> | 8 |
| 2.3.1 Clasificación botánica | 8 |
| 2.3.2 Nombres comunes | 8 |
| 2.3.3 Sinónimos de <i>Alnus acuminata</i> | 9 |
| 2.3.4 Usos | 10 |
| 2.3.5 Descripción | 10 |
| 2.3.6 Hábitat | 11 |
| 2.3.7 Distribución geográfica | 12 |
| | |
| 2.4 TERPENOIDES | 13 |
| 2.4.1 Ruta biosintética del acetato mevalonato | 13 |
| 2.4.2 Triterpenoides | 14 |
| | |
| 3. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 22 |



| | |
|---|-----------|
| 3.1 JUSTIFICACIÓN | 22 |
| 3.2 OBJETIVOS..... | 23 |
| 3.3 HIPÓTESIS | 24 |
| 4 . PARTE EXPERIMENTAL | 25 |
| 4.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS UTILIZADOS..... | 25 |
| 4.1.1 Material vegetal..... | 25 |
| 4.1.2 Reacción general de acetilación..... | 26 |
| 4.2 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LA CORTEZA DE <i>Alnus acuminata</i> | 26 |
| 4.2.1 Método I..... | 26 |
| 4.2.2 Método II..... | 27 |
| 4.2.2.1 Reacción de acetilación del extracto <i>n</i> -butanólico..... | 28 |
| 4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE <i>A. acuminata</i> | 28 |
| 4.3.1 Evaluación de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar en capa delgada en los extractos hexánico (I), clorofórmico (I) y metanólico | 28 |
| 4.3.1.1 Microorganismos utilizados..... | 29 |
| 4.3.1.2 Preparación de la muestra..... | 29 |
| 4.3.1.3 Bioensayo..... | 29 |
| 4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de diluciones en los extractos hexánico (II), AcOEt, clorofórmico (II) y butanólico del segundo extracto | 30 |



| | |
|---|-----------|
| 4.3.2.1 Microorganismos utilizados. | 30 |
| 4.3.2.2 Preparación de las muestras | 31 |
| 4.3.2.3 Preparación del inóculo. | 31 |
| 4.3.2.4 Bioensayo | 32 |
| | |
| 4.4 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO (I) DE LA CORTEZA DE <i>Alnus acuminata</i> | 32 |
| 4.4.1 Análisis cromatográfico del extracto hexánico (I) | 32 |
| 4.4.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico (I) | 32 |
| 4.4.3 Aislamiento de 14-taraxeren-3-ona (1), 14-taraxeren-3-ol (2) y 3-acetoxi-14-taraxereno (3). | 33 |
| 4.4.4 Aislamiento del 3-oxo-lup-20(29)-eno (4) | 35 |
| 4.4.5 Aislamiento de 3 β ,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5) | 35 |
| | |
| 4.5 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO BUTANÓLICO DE LA CORTEZA DE <i>A. acuminata</i> | 36 |
| 4.5.1 Análisis cromatográfico del extracto butanólico | 36 |
| 4.5.2 Aislamiento e identificación de la mezcla de azúcares peracetilados tetraacetil α -D-xilosa (6), pentaacetil D-fructosa (7) y penta-O-acetil α -D-glucopiranososa (8) | 36 |
| 4.5.3 Aislamiento del 2',3',4',6'-O-acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (9). | 37 |
| | |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | 39 |
| | |
| 5.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE <i>Alnus acuminata</i> | 39 |



| | |
|---|----|
| 5.1.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos hexánico (I), clorofórmico (I) y metanólico por la técnica de difusión en agar en capa delgada. | 39 |
| 5.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de dilución en agar de los extractos hexánico (II), de AcOEt, clorofórmico (II) y butanólico | 42 |
| 5.2 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO (I) DE LA CORTEZA DE <i>A. acuminata</i> | 42 |
| 5.2.1 Aislamiento e identificación estructural de 14-taraxeren-3-ona (1). | 42 |
| 5.2.2 Aislamiento e identificación estructural de 14-taraxeren-3-ol (2) | 44 |
| 5.2.3 Aislamiento e identificación estructural de 3-acetoxi-14-taraxereno (3) | 45 |
| 5.2.4 Aislamiento e identificación de 3-oxo-lup-20(29)-eno (4) | 46 |
| 5.2.5 Aislamiento e identificación de 3 β ,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5) | 48 |
| 5.3 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO BUTANÓLICO DE LA CORTEZA DE <i>Alnus acuminata</i> | 49 |
| 5.3.1 Análisis cromatográfico del extracto butanólico. | 49 |
| 5.3.2 Aislamiento e identificación del 2',3',4',6'- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (9). | 51 |
| 6. CONCLUSIONES | 53 |
| 7. PERSPECTIVAS | 54 |
| BIBLIOGRAFÍA | 55 |
| ANEXOS | 61 |



Lista de abreviaturas

| | |
|--------------------------------|---|
| > | Mayor qué |
| % | Por ciento |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| C | Carbono |
| °C | Grados centígrados |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado |
| CG | Cromatografía de gases |
| CHCl ₃ | Cloroformo |
| cm | Centímetros |
| CMI | Concentración Mínima Inhibitoria |
| d | Doblete |
| δ | Desplazamiento químico |
| dd | Doble de dobles |
| ddd | Doble de doble de dobles |
| DEPT | Espectro ampliado sin distorsión por transferencia de polaridad |
| DMAPP | Pirofosfato de dimetil alilo |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| Dr. | Doctor |
| EM | Espectroscopía de Masas |
| EMIE | Espectroscopía de masas por impacto electrónico |
| <i>et al</i> | Y otros |
| FPP | Pirofosfato de farnesilo |
| g | Gramos |
| G+ | Gram positivo |
| G- | Gram negativo |
| GAP | Gliceraldehído 3-fosfato |
| GFPP | Pirofosfato de geranil-farnesilo |
| GGPP | Pirofosfato de geranil-geranilo |
| GPP | Pirofosfato de geranilo |
| H | Hidrógeno |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| H ₂ O | Agua |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| Hz | Hertz |
| IDH | Índice de Deficiencia de Hidrógeno |
| int. rel. | Intensidad relativa. |
| IPP | Pirofosfato de isopentenilo |
| IR | Infrarrojo |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |



| | |
|--|---------------------------------------|
| L | Litros |
| m | Multiplete |
| M ⁺ | Ión molecular |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |
| μL | Microlitros |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| AM | Ácido mevalónico |
| MHz | Megahertz |
| <i>m/z</i> | Relación masa-carga |
| N | Normal |
| NaHCO ₃ | Bicarbonato de sodio |
| Na ₂ SO ₄ | Sulfato de sodio |
| n-BuOH | Butanol |
| (NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄ ·2H ₂ O | Sulfato cérico amoniacal |
| nm | Nanómetros |
| No. | Número |
| NTU | Unidades nefelométricas de turbidez |
| O | Oxígeno |
| OPP | Pirofosfato |
| Pat. | Patente |
| pH | Concentración de iones H ⁺ |
| ppm | Partes por millón |
| R _f | Factor de retención |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| s | Singulete |
| sbsp. | Subespecie |
| SSA | Secretaría de Salud |
| TR | Tiempo de retención |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| umas | Unidades de masa atómica |
| UV | Ultravioleta |
| V _{max} | Frecuencia máxima |

**Lista de figuras**

| | |
|--|----|
| Figura 1. Descripción de <i>A. Acuminata</i> | 11 |
| Figura 2. Distribución de <i>A. Acuminata</i> en México. | 12 |
| Figura 3. Distribución de <i>A. Acuminata</i> en América | 13 |
| Figura 4. Estructuras del isopreno, IPP y DMAPP. | 14 |
| Figura 5. Formación de terpenos a partir de DMAPP e IPP. | 15 |
| Figura 6. Estructura del escualeno. | 15 |
| Figura 7. Ubicación del municipio de Huistán, Chiapas. | 26 |
| Figura 8. Extracción de la corteza de <i>Alnus acuminata</i> por el método I. | 27 |
| Figura 9. Extracción de la corteza de <i>Alnus acuminata</i> por el método II | 28 |
| Figura 10. Distribución de los discos en el medio de cultivo. | 30 |
| Figura 11. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y hexánico. | 40 |
| Figura 12. Estructura de la 14-taraxeren-3-ona (1) | 44 |
| Figura 13. Estructura del 14-taraxeren-3-ol (2). | 45 |
| Figura 14. Estructura del 3-acetoxi-14-taraxereno (3) | 46 |
| Figura 15. Estructura del 3-oxo-20(29)-lupeno (4). | 47 |
| Figura 16. Estructura del 3 β ,28-dihidroxi-20(29)-lupeno (5) | 49 |
| Figura 17. Estructuras de los azúcares identificados en el extracto butanólico | 50 |
| Figura 18. Estructura del 2',3',4',6'- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (9). | 52 |
| Figura 19 . Cromatograma de gases de la fracción 16 (compuestos 1, 2 y 3). | 64 |
| Figura 20. Cromatograma de gases de la fracción 1 (compuesto 4). | 73 |
| Figura 21. Cromatograma de gases de la fracción 15-18 (compuesto 5). | 78 |
| Figura 22. Cromatograma de gases del extracto butanólico acetilado (compuestos 6, 7 y 8). | 80 |

**Lista de espectros**

| | |
|---|----|
| Espectro 1. Espectro en el IR de la fracción 16 (compuestos 1, 2 y 3) | 61 |
| Espectro 2. Espectro de RMN ¹ H de la 14-taraxeren-3-ona (1) | 62 |
| Espectro 3. Espectro de RMN ¹³ C de la 14-taraxeren-3-ona (1). | 63 |
| Espectro 4. Espectro de masas de la 14-taraxeren-3-ona (1) | 65 |
| Espectro 5. Espectro de RMN ¹ H del 14-taraxeren-3-ol (2) | 66 |
| Espectro 6. Espectro de RMN ¹³ C del 14-taraxeren-3-ol (2) | 67 |
| Espectro 7. Espectro de masas del 14-taraxeren-3-ol (2) | 68 |
| Espectro 8. Espectro de masas del 3-acetoxi-14-taraxereno (3) | 69 |
| Espectro 9. Espectro en el IR del 3-oxo-lup-20(29)-eno (4) | 70 |
| Espectro 10. Espectro de RMN ¹ H de la 3-oxo-lup-20(29)-eno (4) | 71 |
| Espectro 11. Espectro de RMN ¹³ C del 3-oxo-lup-20(29)-eno (4) | 72 |
| Espectro 12. Espectro de masas del 3-oxo-lup-20(29)-eno (4) | 74 |
| Espectro 13. Espectro en el IR del 3β,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5) | 75 |
| Espectro 14. Espectro de RMN ¹ H del 3β,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5) | 76 |
| Espectro 15. Espectro de RMN ¹³ C del 3β,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5). | 77 |
| Espectro 16. Espectro de masas del 3β,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5) | 79 |
| Espectro 17. Espectro de masas del tetraacetil α-D-xilosa (6) | 81 |
| Espectro 18. Espectro de masas del pentaacetil D-fructosa (7) | 82 |
| Espectro 19. Espectro de masas del penta- <i>O</i> -acetil α-D-glucopiranososa (8) | 83 |
| Espectro 20. Espectro en el IR del 2',3',4',6'- <i>O</i> -acetil-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (9) | 84 |
| Espectro 21. Espectro de RMN ¹ H del 2',3',4',6'- <i>O</i> -acetil-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (9) | 85 |
| Espectro 22. Espectro de RMN ¹³ C del 2',3',4',6'- <i>O</i> -acetil-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (9). | 86 |



Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Géneros de la familia Betulaceae. | 2 |
| Tabla 2. Metabolitos secundarios mayoritarios del género <i>Alnus</i> | 3 |
| Tabla 3. Estructuras base de distintas familias de triterpenoides. | 16 |
| Tabla 4. Microorganismos utilizados en la determinación de actividad antimicrobiana. | 29 |
| Tabla 5. Volúmenes de disolución de los extractos inoculados en los discos de papel filtro. | 29 |
| Tabla 6. Microorganismos utilizados en la determinación de la CMI. | 31 |
| Tabla 7. Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico. | 33 |
| Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico del extracto butanólico. | 38 |
| Tabla 9. Resultados de la determinación de actividad antimicrobiana por el método por la técnica de difusión en agar en capa delgada. | 40 |
| Tabla 10. Determinación de la concentración mínima inhibitoria por la técnica de dilución en agar. | 41 |



1. INTRODUCCIÓN

Cada sociedad, desde sus orígenes, ha desarrollado sus propios sistemas, procedimientos y modos de curar. Es a este conjunto de técnicas utilizadas en el tratamiento de enfermedades a lo que se llama medicina tradicional, o etnomedicina.

Se define etnomedicina como la propia de un grupo y de una cultura (Brown, 1998), ya que los sistemas terapéuticos se construyen de acuerdo con las características culturales de los grupos. Si varían los sistemas o las culturas, variarán también los conceptos de salud y enfermedad, las formas de abordar los problemas y las soluciones.

La medicina tradicional está fuertemente arraigada en la sociedad mexicana, siendo preferida por muchas personas sobre cualquier otro tipo de tratamiento médico, alternativo o alópata. Desempeña además un papel especialmente importante en comunidades aisladas o de bajos recursos, siendo la única opción conocida o a la que la población tiene acceso en la mayor parte de los casos.

El uso de plantas para el tratamiento de distintas enfermedades es una práctica ampliamente difundida en el mundo que ha sido utilizada desde tiempos ancestrales. Las plantas medicinales constituyen la base de la medicina tradicional y representan una fuente valiosa de compuestos biológicamente activos, y de prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos para la medicina moderna.

La cantidad de estudios fitoquímicos realizados a las plantas mexicanas, abarca un número limitado de especies, que representan un porcentaje muy bajo con respecto a la totalidad de plantas medicinales, de las que se conoce su existencia desde tiempos prehispánicos.

En la presente tesis se presenta un estudio fitoquímico de la especie *Alnus acuminata* sbsp. *Arguta* (Schlecht.) Furlow, como parte de un proyecto en colaboración, enfocado en la investigación en plantas medicinales.



2. ANTECEDENTES

2.1 FAMILIA BETULACEAE

Esta familia está constituida por alrededor de seis géneros y 120 especies distintas de árboles y arbustos monoicos con hojas alternadas y simples, la mayor parte ubicada en países de clima templado del hemisferio norte. Las flores masculinas se presentan en forma de péndulos, mientras que las femeninas se presentan en agregados de dos o tres flores ubicadas en las axilas. Los frutos pueden tener forma de nueces o presentar proyecciones membranosas aladas que ayudan a su dispersión por el viento.

Tabla 1. Géneros de la familia Betulaceae

| Género | No. De especies | Ejemplo |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|
| <i>Alnus</i> | 30 | <i>Alnus acuminata</i> |
| <i>Betula</i> | 40 | <i>Betula pubescens</i> |
| <i>Carpinus</i> | 30 a 40 | <i>Carpinus Betulus</i> |
| <i>Corylus</i> | 10 | <i>Corylus avellana</i> |
| <i>Ostrya</i> | 9 | <i>Ostrya virginiana</i> |
| <i>Ostryopsis</i> | 2 | <i>Ostryopsis davidiana</i> |

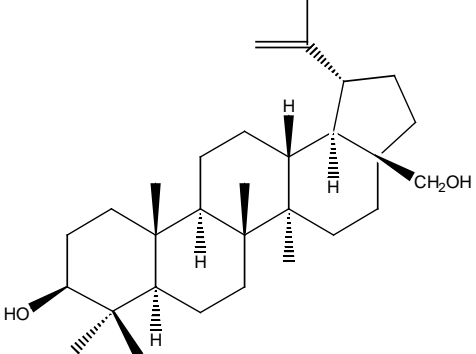
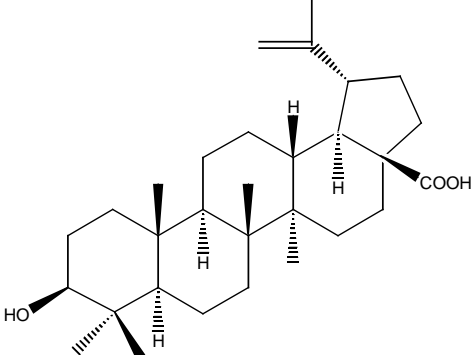
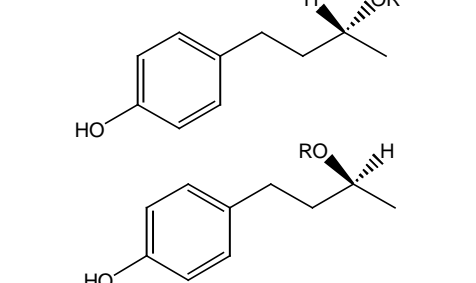
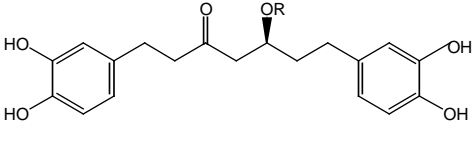
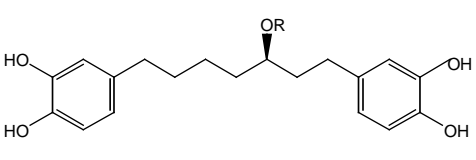
2.2 GÉNERO *Alnus*

Comprende 30 especies de árboles o arbustos monoicos comúnmente conocidos como Aliso, entre las que se encuentran *Alnus acuminata*, *A. japonica*, *A. glutinosa*, *A. hirsuta*, *A. incana*, *A. rubra*, *A. rugosa*, *A. serrulata*, *A. oregona* y *A. viridis* (García, 2006).

2.2.1 Composición química

El género *Alnus* biosintetiza diversos tipos de compuestos, como taninos, terpenos, azúcares, flavonoides, esteroides, saponinas y compuestos fenólicos; algunos de los cuales son de interés para la medicina, como la betulina, el ácido betulínico, la acetina o el betulenol (**Tabla 2**). La diferencia en la composición química de una especie de *Alnus* con respecto a otra, ha servido además para su clasificación por quimiotaxonomía.

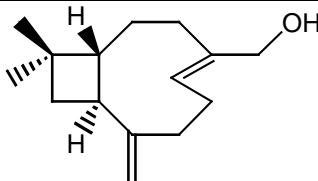
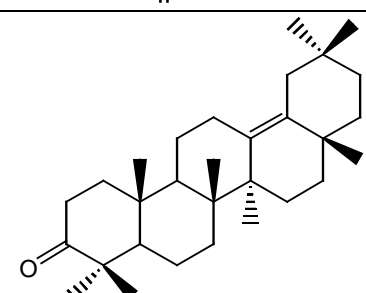
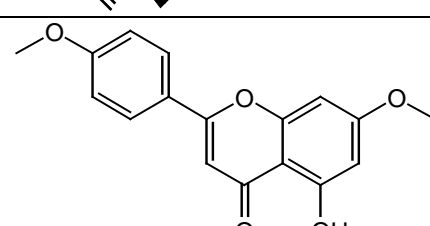
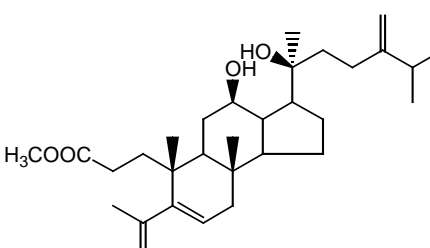
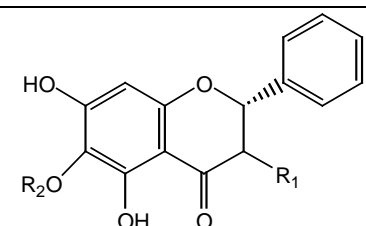
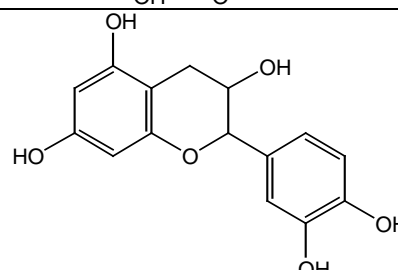
**Tabla 2.** Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Alnus*.

| Nombre | Fórmula | Referencia |
|--|--|--|
| Betulina; Betulol; Betulinol; Trochol: 20(29)-lupeno-3 β ,28-diol |  | Evans, 1985. Harborne, 1991. Duke, 1992. Mañes <i>et al.</i> , 1997. Huguet <i>et al.</i> , 2000. |
| Ácido betulínico: ácido 3 β -hidroxi-20(29)- lupen-28-oico. |  | Galgon <i>et al.</i> , 1999. Duke, 1992. Huguet <i>et al.</i> , 2000. Mañes <i>et al.</i> , 1997. Steele <i>et al.</i> , 1999. |
| (-)-Rododendrol: R = H Rododendrina: R = Glc (+)-Rododendrol: R = H Rododendrina: R = Glc |  | Harborne, 1991. Santamour <i>et al.</i> , 1997. Klischies <i>et al.</i> , 1978. |
| Hanokina R = Xil R = H |  | Min <i>et al.</i> , 2000. |
| Oregonina R = Xil R = Glc |  | Min <i>et al.</i> , 2000. |

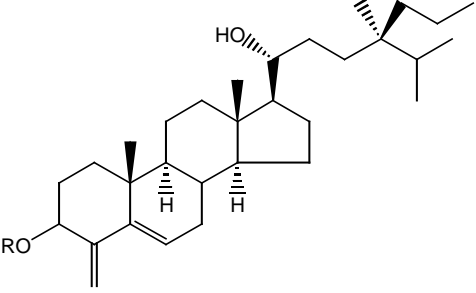
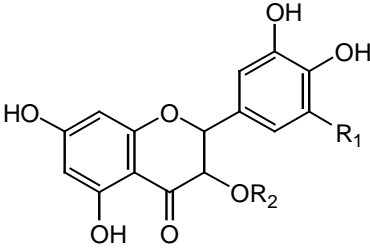
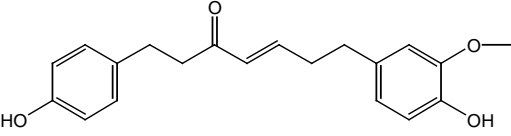
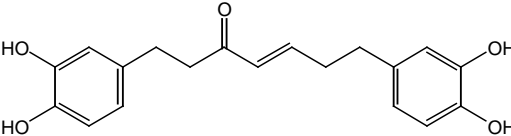
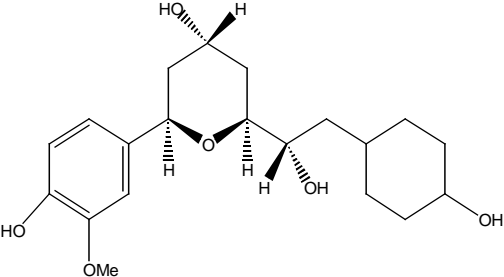
**Tabla 2.** Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Alnus* (Continuación).

| Nombre Químico | Fórmula | Referencia |
|--|---------|--|
| Platipilósida R ₁ = GlcPir, R ₂ = H R ₁ = GlcPir, R ₂ = OH R ₁ = Xil, R ₂ = H R ₁ = H, R ₂ = H | | Chen <i>et al.</i> , 2000. Matsuda <i>et al.</i> , 1998. |
| 2,3,4-Trimetoxifenantreno | | Tori <i>et al.</i> , 1995. |
| Alnustinol | | Duke, 1992. Yu <i>et al.</i> , 2007. |
| Alnusdiol | | Hanawa <i>et al.</i> , 1997. |
| Glutanxona | | Peres <i>et al.</i> , 2000. |
| Acacetina; Linarigenina: 4-metil éter apigenina | | Harbone, 1991. Evans, 1985. Keinänen <i>et al.</i> , 1998. |
| α-betulenol | | Demirci <i>et al.</i> , 2000. Evans, 1985. |

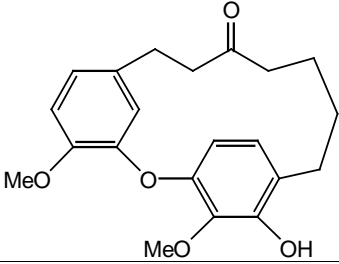
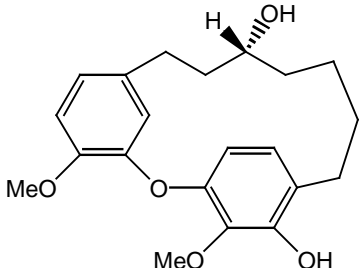
**Tabla 2.** Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Alnus* (Continuación).

| Nombre Químico | Fórmula | Referencia |
|------------------------------------|--|---|
| β -betulenol |  | Demirci <i>et al.</i> , 2000. Evans, 1985 |
| δ -amirona |  | Salama <i>et al.</i> , 2005 |
| 4',7-dimetoxiapigenina |  | Salama <i>et al.</i> , 2005 |
| Ester metílico del ácido alnústico |  | Yu <i>et al.</i> , 2007 |
| Pinocembrina $R_1 = R_2 = H$ |  | Yu <i>et al.</i> , 2007 |
| Catequina (tanto R como S) |  | Yu <i>et al.</i> , 2007 |

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Alnus* (Continuación).

| Nombre Químico | Fórmula | Referencia |
|---|--|--------------------------|
| <p>β-sitosterol R = H</p> <p>3-O-β-D-glucopiranosido de β-sitosterol R = β-D-glucopiranososa</p> |  | Yu <i>et al.</i> , 2007 |
| <p>Quercetina R₁ = R₂ = H</p> <p>3-O-α-L-arabinofuranósido de quercetina R₁=H R₂=α-L-arabinofuranosa</p> <p>Quercitrina R₁= H R₂= α-L-ramnopiranososa</p> <p>Isoquercitrina R₁ = H R₂= β-D-glucopiranososa</p> <p>3-O-β-D-Galactopiranosido de miricetina R₁=OH R₂=β-D-galactopiranososa</p> |  | Yu <i>et al.</i> , 2007 |
| 1-(4-hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-hepten-3-ona |  | Jin <i>et al.</i> , 2007 |
| Hirsutanona |  | Jin <i>et al.</i> , 2007 |
| Rhoiptelol B |  | Jin <i>et al.</i> , 2007 |

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios mayoritarios. (Continuación).

| Nombre Químico | Fórmula | Referencia |
|--|--|--------------------------|
| 2-oxatriciclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7-(20)-15,17,18-hexaen-10-ona |  | Jin <i>et al.</i> , 2007 |
| 2-oxatriciclo[13.2.2.13,7]eicosa-3,5,7-(20)-15,17,18-hexaen-10,16-diol |  | Jin <i>et al.</i> , 2007 |

2.2.2 Actividad biológica

Las especies que componen al género *Alnus*, han mostrado distintas actividades biológicas, mismas que se correlacionan con las propiedades que se les atribuyen popularmente (García, 2006).

- *Alnus hirsuta* se usa en el tratamiento contra cáncer de seno y contiene compuestos que han demostrado actividad antiinflamatoria.
- *Alnus rubra* se utiliza para tratar infecciones micóticas cutáneas, y se ha podido comprobar su actividad antimicrobiana.
- *Alnus glutinosa* posee propiedades antiinflamatorias, antisépticas, antitumorales e inmunosupresoras
- *Alnus oregona* se usa para el tratamiento de distintos tipos de cáncer.
- *Alnus hirsuta* presenta propiedades antifebriles, antidiarreicas y antiinflamatorias.
- *Alnus incana* se utiliza como antiparasitario y en el tratamiento de infecciones cutáneas, leucemia, cáncer de útero y de piel.
- *Alnus maximowiczii* se usa en contra de infecciones dérmicas e intestinales.



- *Alnus acuminata* presenta actividad antiescrofulosa, astringente y antiinflamatoria en infecciones cutáneas.

2.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE *Alnus acuminata*

2.3.1 Clasificación botánica (García, 2006)

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Fagales
Familia: Betulaceae
Género: *Alnus*
Especie: *Alnus acuminata*

2.3.2 Nombres comunes (<http://www.conafor.gob.mx>, <http://www.conabio.gob.mx>, <http://herbaria.plants.ox.ac.uk>)

En México

- Aliso
- Aile
- Abedul (Veracruz)
- Olmo del país (Veracruz, Hidalgo)
- Elite (Oaxaca)
- Palo de águila (Oaxaca)
- Yaga-bizie (Oaxaca)
- Ilite (Chiapas)



En América Latina

- Ilamo (Guatemala)
- Palo de lama (Guatemala)
- Jaul (Costa Rica, Honduras)
- Lambrán (Costa Rica, Guatemala)
- Labrán (Perú)
- Cerezo (Colombia)

2.3.3 Sinónimos de *Alnus acuminata* subsp. *arguta* (<http://www.conafor.gob.mx>, <http://www.conabio.gob.mx>, <http://herbaria.plants.ox.ac.uk>)

- *Alnus arguta* (Schlecht.) Spach
- *Alnus arguta* var. *cuprea* Bartlett
- *Alnus arguta* var. *subserica* Bartlett
- *Alnus ferruginea* HBK
- *Alnus ferruginea* var. *aliso* Lorentz & Hieron. Ex Winckler
- *Alnus jorullensis* HBK
- *Alnus jorullensis* var. *acuminata* (Kunth) Kuntze
- *Alnus mirbelii* Spach
- *Alnus spachii* Callier
- *Alnus acuminata* var. *spachii* Regel
- *Alnus pringlei* Fernald
- *Alnus ovalifolia* Bartlett
- *Alnus guatemalensis* Gandoger
- *Betula arguta* Schlecht.



2.3.4 Usos

La madera de este vegetal se utiliza como material de construcción (pilotes, puentes), en mueblería, ebanistería, embalaje y para la fabricación de artesanías. Las podas se usan normalmente como leña o para composta, rara vez como forraje. La corteza es astringente y rica en taninos, por lo que es utilizada para curtir pieles. En el campo agrícola da sombra a los cultivos, además de que abona el suelo a su alrededor al tener una buena fijación de nitrógeno. El polen que produce es de utilidad para la apicultura, especialmente en invierno cuando escasean otras fuentes de alimento.

Se le atribuyen distintas propiedades medicinales. Las hojas maceradas se usan para tratar dolores musculares y de articulaciones, en infusión para la inflamación de próstata, y como cataplasmas para detener hemorragias, favorecer la cicatrización de heridas, aliviar dolores de cabeza y como antiinflamatorio. La infusión de la corteza se utiliza en enfermedades cutáneas y venéreas. Los extractos del fruto se utilizan para aliviar la inflamación de garganta.

Ha sido utilizado en programas de reforestación junto con otras especies del mismo género por su efecto restaurador en el suelo (<http://www.conafor.gob.mx>, <http://herbaria.plants.ox.ac.uk>).

2.3.5 Descripción

Son árboles o arbustos monoicos de entre 10 y 30 metros de altura, de tronco color grisáceo y ramas lisas de color café rojizo. Pierde sus hojas normalmente de noviembre a mayo y florece de mayo a junio. Tiene hojas simples, alternas, oblongadas, grabadas en el haz y de bordes aserrados, de entre 7 y 13 cm de longitud y entre 3 y 9 de ancho. La inflorescencia es unisexual, es decir que las flores masculinas y femeninas se presentan por separado, y presenta frutos samaroides, con una extensión membranosa en forma de ala. **Figura 1.**



Figura 1. Descripción de *A. Acuminata* (<http://www.conafor.gob.mx>,
<http://darnis.inbio.ac.cr>)

2.3.6 Hábitat

Se desarrolla en climas templados y con alturas que van desde los 600 hasta los 3000 metros sobre el nivel del mar, en suelos arenosos o arcillosos con pH entre 4 y 6, una temperatura mínima de 4°C y máxima de 28°C, y precipitaciones de entre 1500 y 3000 mm. En las partes altas se encuentra en bosques con forma de galería, y su población puede ser dominante o codominante.



Las poblaciones de *Alnus* tienen dos principales afinidades ecológicas, se encuentran a la orilla de arroyos o pequeños ríos, o bien forman comunidades sucesorias, que surgen como consecuencia de la destrucción de algún otro bosque (<http://www.conafor.gob.mx>, <http://darnis.inbio.ac.cr>, <http://www.arboles.org>)

2.3.7 Distribución geográfica

En la República Mexicana se encuentra en los estados de Sonora, Durango, Sinaloa, Jalisco, Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz, Michoacán, Nayarit, Puebla, Querétaro, Oaxaca, Chiapas y el Distrito Federal. Fuera de la República Mexicana, se le puede encontrar en gran parte de América Latina, desde Argentina hasta Guatemala, habiéndose introducido con éxito en el sur de Chile y Nueva Zelanda. **Figuras 2 y 3.**

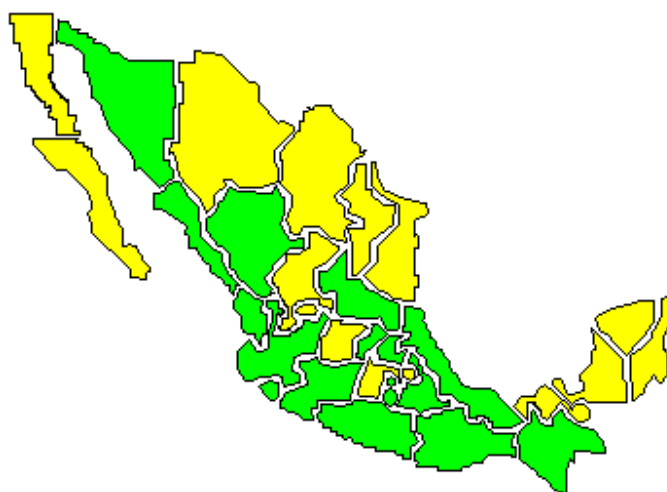


Figura 2. Distribución de *A. Acuminata* en México. En verde se marcan los estados en los que existe una importante presencia de la especie, en amarillo aquellos donde su presencia no se reporta.



Figura 3. Distribución de *A. Acuminata* en América. En verde se marcan los países en los que existe una importante presencia de la especie, en amarillo aquellos donde su presencia no se reporta (<http://www.conafor.gob.mx>, <http://darnis.inbio.ac.cr>, <http://herbaria.plants.ox.ac.uk>).

2.4 TERPENOIDES

2.4.1 Ruta biosintética del acetato-mevalonato.



Los terpenoides son una familia de productos naturales cuya estructura deriva de una o más unidades de isopreno (**Figura 4**). Dependiendo de cuantas unidades de isopreno conforman a los terpenoides, éstos se clasifican en hemiterpenoides, monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, sesterterpenoides, triterpenoides, tetraterpenoides y politerpenoides; de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho o más unidades de isopreno de manera respectiva.

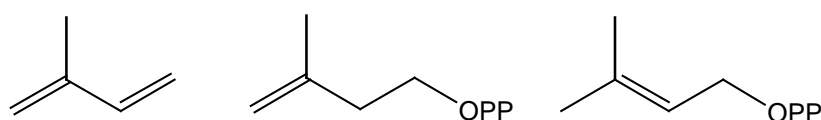


Figura 4. Estructuras del isopreno, IPP y DMAPP.

Las unidades de isopreno bioquímicamente activas que están relacionadas con la formación de los terpenoides, son el DMAPP y el IPP (**Figura 4**). Estas unidades de isopreno se forman en la naturaleza por medio de dos vías distintas, una a partir del AM, que es un producto del metabolismo del acetato, y la otra a partir de desoxixilulosa fosfato, que es formada a partir de ácido pirúvico y gliceraldehído-3-fosfato, siendo ambos intermediarios de la ruta de la glicólisis.

2.4.2 Triterpenoides

Como se aprecia en la **Figura 5**, los triterpenoides se conforman de seis unidades de isopreno, por lo que su estructura base cuenta con 30 átomos de carbono. Tienen como precursor inicial al escualeno (**Figura 6**), el cual se forma a partir de la condensación cola-cola de dos unidades de pirofosfato de farnesilo, y da origen al lanosterol y al cicloartenol, precursores a su vez de esteroides en animales y plantas respectivamente.

En el caso de los triterpenos pentacíclicos, el escualeno da origen al catión damarenilo, a partir del cual se forman el lupeol y el taraxasterol, entre otros precursores de las distintas familias de triterpenos pentacíclicos.

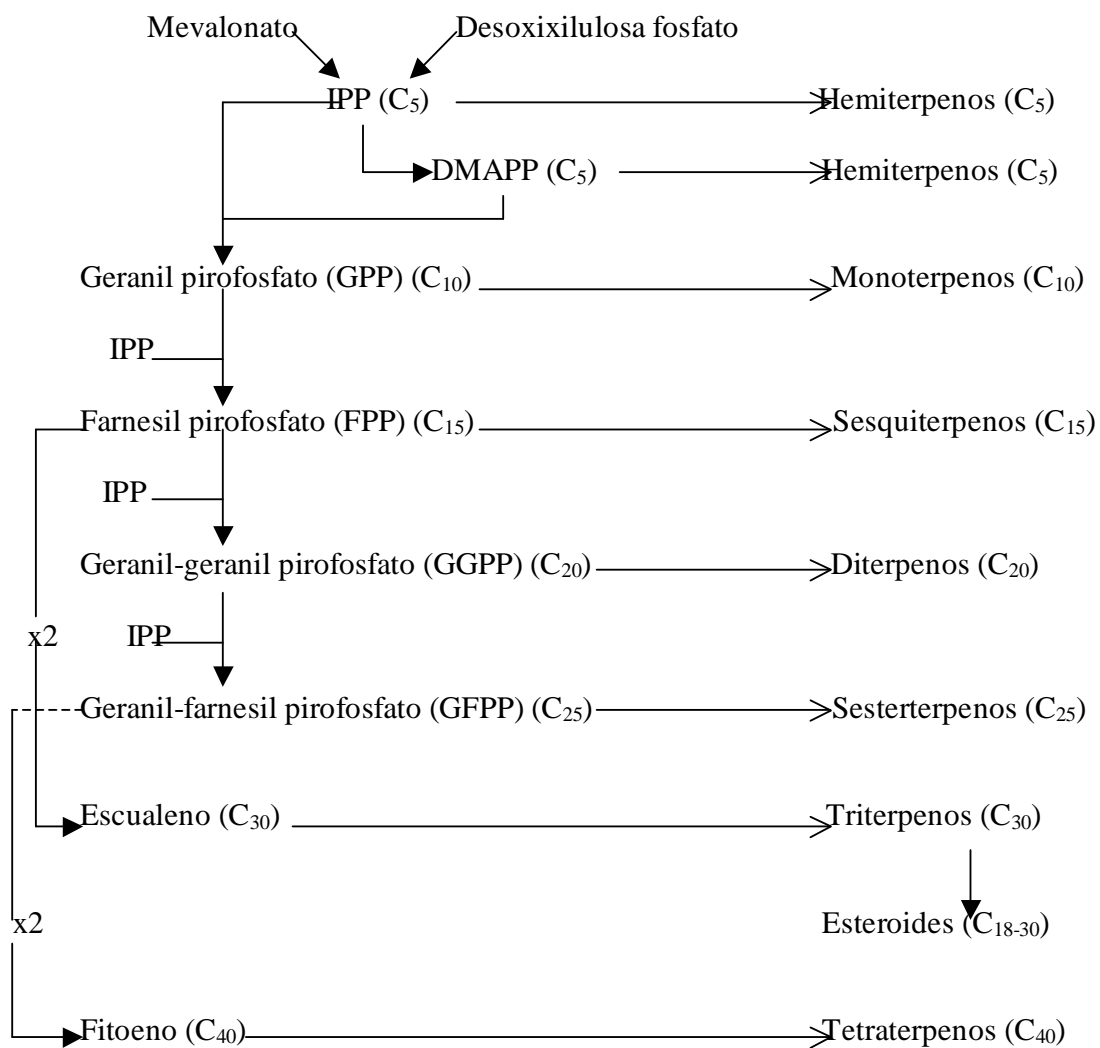


Figura 5. Formación de terpenos a partir de DMAPP e IPP.

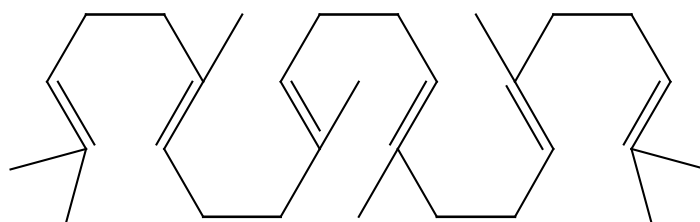


Figura 6. Estructura del escualeno



Dentro de los triterpenoides se encuentran distintas familias de compuestos, como los lupanos, oleananos y taraxeranos, que a pesar de ser similares entre sí, presentan ciertas diferencias que los hacen distinguibles. En la **Tabla 3** se presentan las estructuras básicas de las distintas familias de triterpenos pentacíclicos (Dewick, 2002; Uddin, 1994).

Tabla 3. Estructuras base de distintas familias de triterpenoides.

| Familia | Estructura base numerada |
|-------------|--------------------------|
| Oleananos | |
| Taraxeranos | |
| Friedelanos | |

**Tabla 3.** Estructuras base de distintas familias de triterpenoides. (Continuación).

| Familia | Estructura base numerada |
|---------------|--------------------------|
| Glutinanos | |
| Multifloranos | |
| Ursanos | |
| Friedoursanos | |

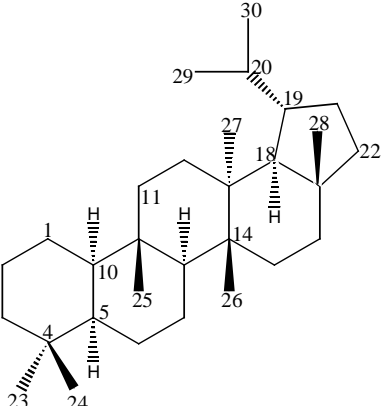
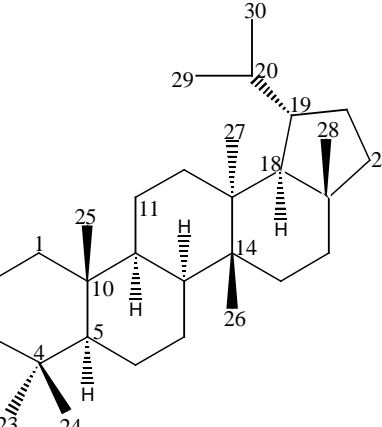
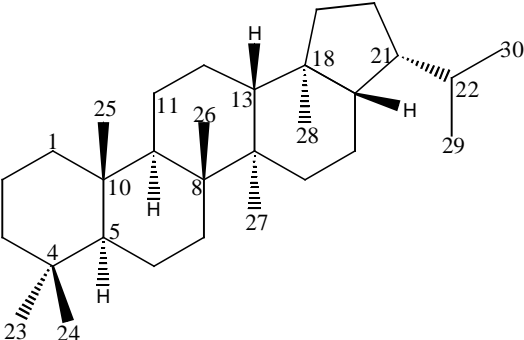
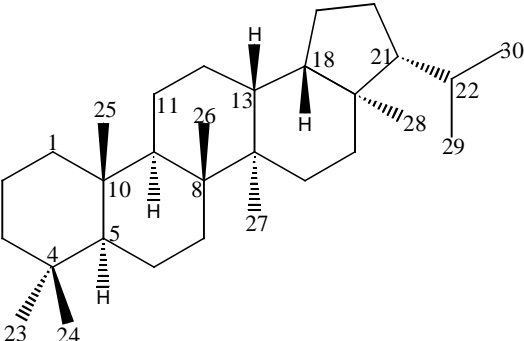
**Tabla 3.** Estructuras base de distintas familias de triterpenoides. (Continuación).

| Familia | Estructura base numerada |
|---------------------------|--------------------------|
| Baueranos | |
| Serratanos | |
| Gamaceranos | |
| D:C- Friedogamaceranos | |

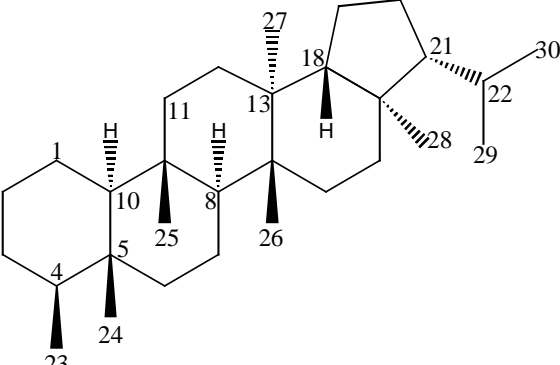
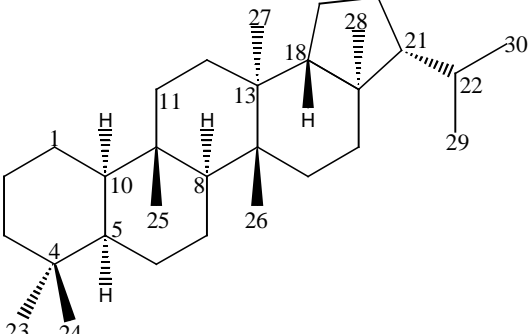
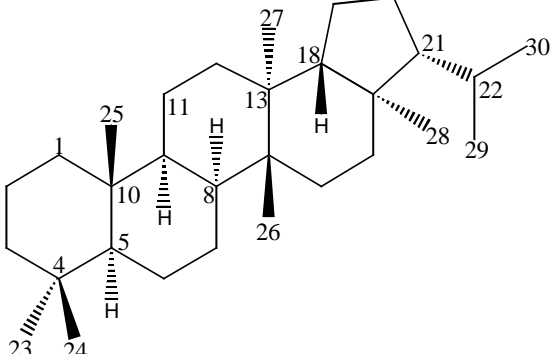
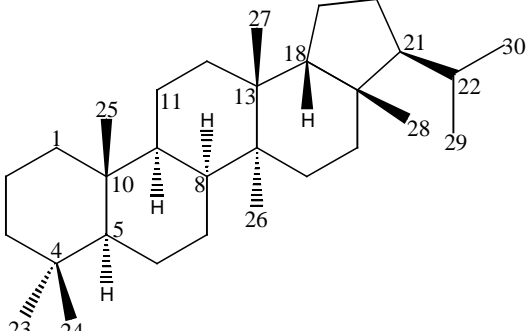
**Tabla 3.** Estructuras base de distintas familias de triterpenoides. (Continuación).

| Familia | Estructura base numerada |
|-------------------|--------------------------|
| Estictanos | |
| Lupanos | |
| D:Friedolupanos | |
| D:A-Friedolupanos | |

**Tabla 3.** Estructuras base de distintas familias de triterpenoides. (Continuación).

| Familia | Estructura base numerada |
|-------------------|--|
| D:B-Friedolupanos |  |
| D:C-Friedolupanos |  |
| Hopanos |  |
| Neohopanos |  |

**Tabla 3.** Estructuras base de distintas familias de triterpenoides. (Continuación).

| Familia | Estructura base numerada |
|-----------|--|
| Filicanos |  |
| Adiananos |  |
| Fernanos |  |
| Arboranos |  |



3. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVO E HIPÓTESIS.

3.1 JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó en la introducción, México es un país con amplia tradición en el uso de preparados medicinales provenientes de plantas, sin embargo, éstas no son inocuas y en la gran mayoría de los casos su utilización no está respaldada por los estudios pertinentes, lo que implica un riesgo para el consumidor. Se justifica entonces, realizar un estudio por medio del cual se conozcan los principios que pudieran resultar benéficos para la salud del ser humano, pero también los que pudieran resultar dañinos para la misma.

Dentro de las plantas medicinales de amplio uso en el sureste de nuestro país, *Alnus acuminata* es apreciada por las propiedades anti-inflamatoria y anti-escrofulosa que exhiben los preparados de su corteza (<http://www.conafor.gob.mx>). En la Secretaría de Salud existe la patente de una mezcla de este vegetal, como Formulación Herbolaria, para el tratamiento y cura de la psoriasis (permiso sanitario 011RH/2003 SSA; Pat. No. 243578), y por otra parte, existe una patente internacional para este mismo preparado llamado Skaskahs, también recomendado para el tratamiento de la psoriasis (Pat. No. 243578 PCT/MX2005/000036). Sin embargo, la posible actividad antiinflamatoria de los metabolitos de la planta, cobra gran importancia pues la planta se usa para tratar procesos inflamatorios.

Existen antecedentes de pruebas anti-inflamatorias realizadas a los extractos de diferentes polaridades de la planta, las cuales mostraron resultados claramente positivos (Rovelo, 2002; Gómez, 2007), sin embargo, estos bioensayos han sido parciales ya que han tenido como meta la comprobación de la actividad biológica de los extractos. Por lo anterior es muy importante el estudio químico dirigido a la búsqueda de los principios en los que recae la actividad antiinflamatoria. A su vez, ese estudio químico ayudará a establecer los parámetros de composición y pureza de la droga, que podrán eventualmente incorporarse a la monografía de la planta.



Por otra parte, la inflamación de los ganglios linfáticos (escrófulas), implica en la mayor parte de los casos una infección por un microorganismo particular, por lo que es pertinente la realización de un análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza del material vegetal de este estudio frente a cultivos representativos de bacterias, hongos y levaduras.

3.2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es generar conocimiento acerca de la composición química y de parámetros de actividad antimicrobiana de la especie medicinal *Alnus acuminata* sbsp *Arguta*.

Para ayudar al cumplimiento del objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos particulares:

-Preparar los extractos orgánicos de diferente polaridad de la corteza del vegetal por un proceso de maceración.

-Hacer pruebas de actividad anti-microbiana en los distintos extractos obtenidos contra bacterias Gram positivas y negativas, así como en hongos levaduriformes y filamentosos representativos.

-Determinar si alguno de los extractos presenta actividad antimicrobiana contra microorganismos Gram positivos, particularmente *Staphylococcus aureus*.

-Realizar el fraccionamiento de los extractos obtenidos y separar los compuestos mayoritarios por métodos cromatográficos.

-Identificar la estructura de los compuestos aislados mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.



3.3 HIPÓTESIS

De acuerdo a informes en la literatura, las plantas del género *Alnus*, presentan en su composición química una serie de metabolitos secundarios entre los que destacan triterpenoides con esqueleto de taraxerano y de lupano; por lo anterior, se espera identificar compuestos de este tipo en el estudio químico de *Alnus acuminata*. Además, también se ha reportado actividad antimicrobiana en algunas especies del género, por lo que se espera encontrar actividad de este tipo, en al menos uno de los extractos.



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS UTILIZADOS

El proceso de fragmentación del material vegetal se llevó a cabo en un molino de cuchillas modelo Thomas-Willey 4.

Los análisis por cromatografía en capa fina se llevaron a cabo en cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ Macharey-Nagel Duren. Como reveladores cromatográficos se utilizaron una lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF-240c de longitud de onda a 254 y 365 nm, y solución de sulfato cérico amoniacal ($(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1% con H_2SO_4 2N) (Stahl, 1969).

Los espectros de RMN se determinaron a 300 MHz y 75.3 MHz para ^1H y ^{13}C respectivamente, en espectrómetros de alta resolución Varian (Unity Inova) 300 y Varian (Unity Inova) 400, dependiendo del caso, y se empleó CDCl_3 como disolvente. Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR Perkin-Elmer 1605, mientras que los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro modelo JEOL SX102A, utilizando la técnica de ionización química. Todos los espectros se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de esta facultad.

4.1.1 Material vegetal

Los tallos de *Alnus acuminata* subsp. *Arguta* fueron recolectados en el municipio de Huistán Chiapas (**Figura 7**), la identificación del material vegetal fue hecha por el Dr. Mario Ishiki Ishihara del Herbario del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) en Chiapas, donde se encuentra depositada una muestra de referencia. Esta planta nos fue donada por el Dr. Andrés Navarrete Castro. El material vegetal se sometió primero a un proceso de desecación utilizando una fuente de calor natural bajo sombra y posteriormente a un proceso de fragmentación.

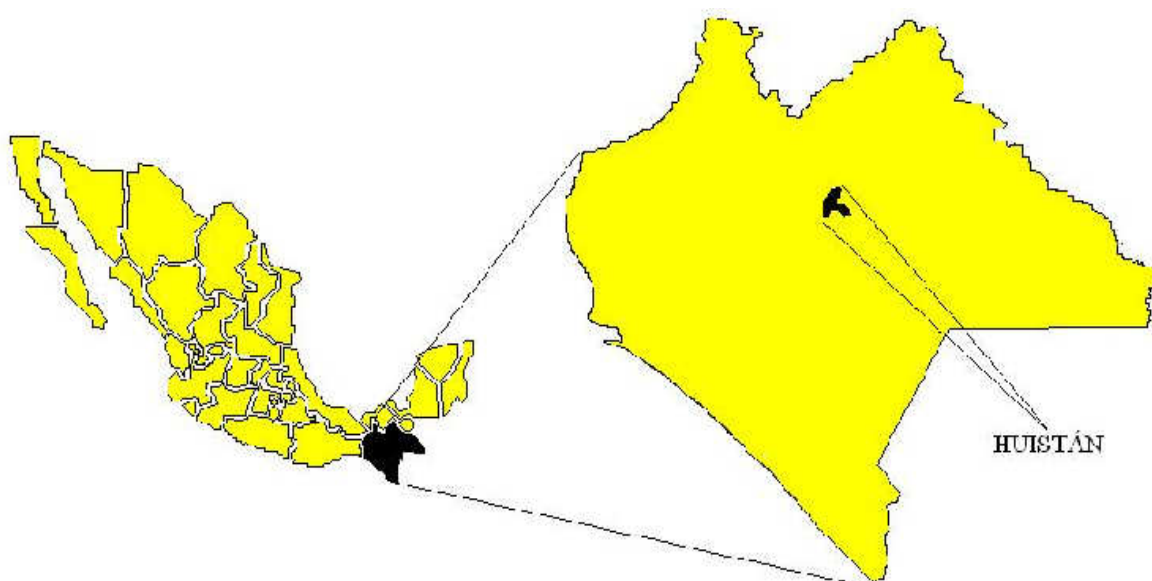


Figura 7. Ubicación del municipio de Huistán, Chiapas.

4.1.2 Reacción general de acetilación

A 100 mg de la compuesto o fracción se adicionan 1.0 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se añaden 5.0 g de agua/hielo y se acidula con una solución de HCl al 10%. Posteriormente se extrae con 3 porciones de 15 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se extrae con 3 porciones de 5 mL de solución saturada de NaHCO_3 , después con 3 porciones de 5 mL de agua; finalmente el extracto orgánico se seca con Na_2SO_4 anhidro y por evaporación del disolvente se obtienen los productos acetilados.

4.2 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LA CORTEZA DE *Alnus acuminata*.

4.2.1 Método I.



El material vegetal (2000.0 g de corteza de *Alnus acuminata*) previamente fragmentado y seco, se extrajo sucesivamente mediante maceraciones exhaustivas con hexano, CHCl_3 y MeOH, en orden ascendente de polaridad y a temperatura ambiente. Se obtuvieron los extractos hexánico (I), clorofórmico (I) y metanólico. En la **Figura 8** se presenta el esquema de este fraccionamiento (Rovelo, 2002).

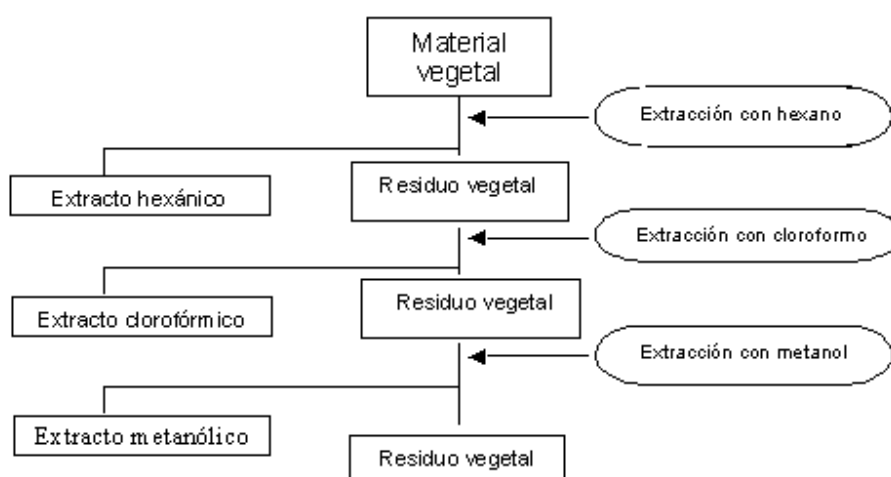


Figura 8. Extracción de la corteza de *Alnus acuminata* por el método I.

4.2.2 Método II.

El material vegetal (935.0g de corteza de *Alnus acuminata* previamente fragmentada y seca), se extrajo exhaustivamente por el método de maceración a temperatura ambiente con etanol durante dos semanas, empleando volúmenes de 2 L en cada ocasión. El extracto obtenido se disolvió en una mezcla de etanol:agua 8:2 y se trató por el método de partición con hexano, CHCl_3 , AcOEt y n-BuOH, en orden creciente de polaridad. En la **Figura 9** se presenta el fraccionamiento por el método II (Lunardi *et al.*, 2001).



4.2.2.1 Reacción de acetilación del extracto *n*-butanólico.

400 mg de la fracción butanólica se acetilaron con 4.0 mL de anhídrido acético y 1.2 mL de piridina a temperatura ambiente y con agitación magnética durante 92 h. El producto de la reacción se procesó conforme a la técnica descrita en el punto 3.1.2.

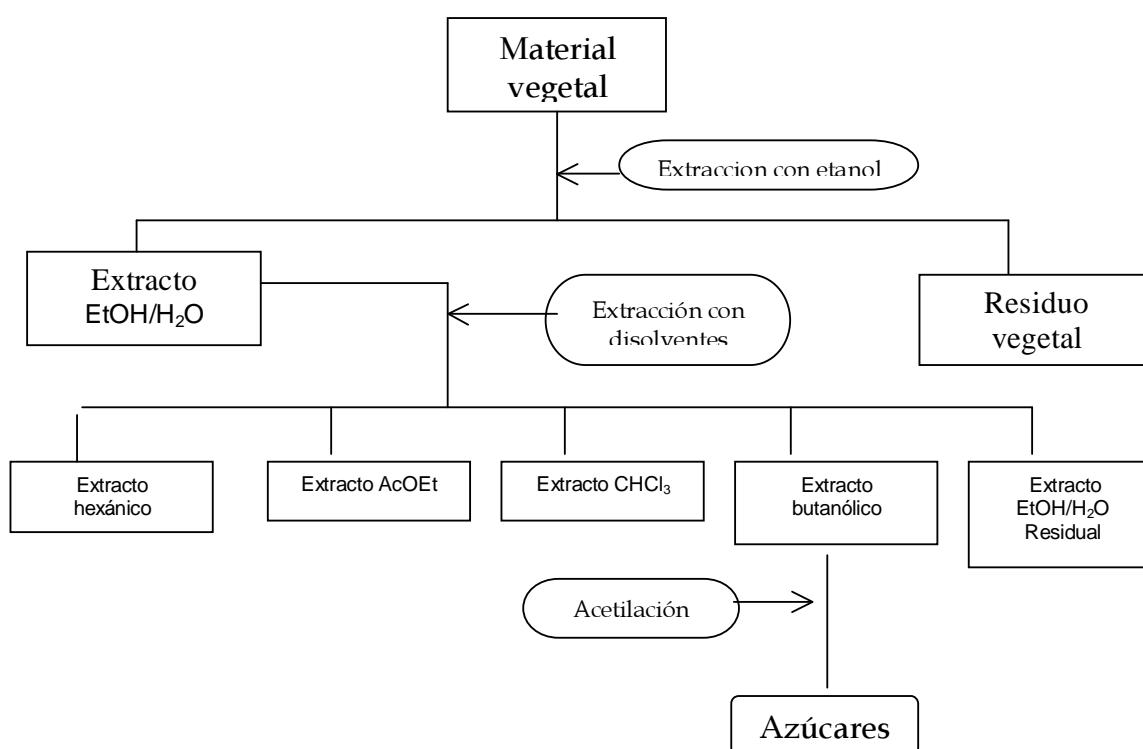


Figura 9. Extracción de la corteza de *A. acuminata* por el método II

4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE *A. acuminata* (Mitscher *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 2005).

4.3.1 Evaluación de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar en capa delgada en los extractos hexánico (I), clorofórmico (I) y metanólico.



4.3.1.1 Microorganismos utilizados

Tabla 4. Microorganismos utilizados en la determinación de actividad antimicrobiana

| Microorganismo | Descripción |
|-------------------------------------|---------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Bacteria G+ |
| <i>Escherichia coli</i> | Bacteria G - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bacteria G - |
| <i>Candida albicans</i> | Hongo levaduriforme |
| <i>Tricophyton mentagrophytes</i> | Hongo filamentoso |
| <i>Microsporum canis</i> | Hongo filamentoso |

4.3.1.2 Preparación de la muestra

Se prepararon disoluciones de 10mg/mL de concentración de los extractos hexánico (I), clorofórmico (I) y metanólico, utilizando DMSO como disolvente, posteriormente se inocularon discos de papel filtro de 13 mm de diámetro, con las disoluciones de la manera en que se muestra en la **Tabla 5**. Como control negativo se utilizó DMSO 100 μ L por disco. Todo el proceso de preparación de muestra se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Tabla 5. Volúmenes de disolución de los extractos inoculados en los discos de papel filtro.

| Volumen inoculado (microlitros) | Concentración en disco (microgramos de muestra) |
|---------------------------------|---|
| 100 | 1000 |
| 50 | 500 |
| 10 | 100 |

4.3.1.3 Bioensayo

Los ensayos se realizaron por duplicado en placas de agar Müller-Hinton para el caso de las bacterias y de agar Saboraud en el caso de los hongos. Las placas se prepararon añadiendo 8 mL de agar previamente inoculado con 80 μ L del microorganismo de prueba ajustado a 50 NTU, sobre una base de 10 mL de agar sin inocular.



Una vez solidificado el agar, se colocaron 4 discos de papel filtro en la superficie del agar de cada placa, de la manera indicada en la **Figura 10**; tres de los discos habían sido inoculados con los volúmenes del extracto a ser probado, indicados en la **Tabla 5**, mientras que el cuarto se inoculó con el blanco (DMSO).

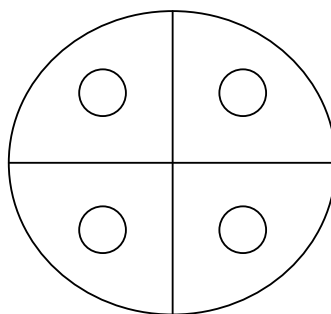


Figura 10. Distribución de los discos en el medio de cultivo.

Para evaluar los resultados, las cajas inoculadas con bacterias y la levadura, se incubaron durante 24 horas a 37°C, y durante 5 días en el caso de los hongos dermatofitos (28°C). Todo el bioensayo se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, a fin de evitar la presencia de contaminantes en el medio. La actividad antimicrobiana se determinó midiendo en mm los halos de inhibición de crecimiento microbiano alrededor de cada disco (Villareal *et al.*, 1994; Alanís *et al.*, 2005).

4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de dilución en agar de los extractos hexánico (II), de AcOEt, clorofórmico (II) y butanólico.

4.3.2.1 Microorganismos utilizados

**Tabla 6.** Microorganismos utilizados en la determinación de la CMI.

| Microorganismo | Descripción |
|-----------------------------------|---------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Bacteria G+ |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | Bacteria G+ |
| <i>Escherichia coli</i> | Bacteria G - |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Bacteria G - |
| <i>Salmonella tiphy</i> | Bacteria G - |
| <i>Candida albicans</i> | Hongo levaduriforme |
| <i>Tricophyton mentagrophytes</i> | Hongo filamentoso |
| <i>Tricophyton rubrum</i> | Hongo filamentoso |

4.3.2.2 Preparación de las muestras

Los extractos (10 mg) fueron disueltos en 1 mL de disolvente, en unos casos se emplearon mezclas de dimetil sulfóxido en agua en proporción no mayor de 1:8 o solución al 10% en agua de tween 20 o de tween 80, según la solubilidad del extracto correspondiente. A partir de esta disolución, se prepararon diluciones para obtener concentraciones finales en un rango de 0.375 a 3 mg/mL.

4.3.2.3 Preparación del inóculo

Para activar las cepas, las bacterias se desarrollaron en caldo nutritivo, la levadura y los hongos filamentosos se desarrollaron en agar Sabouraud y se incubaron durante un periodo de 48 horas a 37°C las bacterias y durante 7 días a 28°C, los hongos.

El inóculo de cada muestra de bacterias fue preparado a partir de cultivos que contenían 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. El inóculo de *Candida albicans* tenía una concentración final de 10^5 células/mL, y de 10^6 esporas/mL para los hongos filamentosos. Las concentraciones de los inóculos fueron establecidas por comparación contra estándares turbidimétricos establecidos (escala de McFarland).



4.3.2.4 Bioensayo.

Las muestras preparadas a diferentes diluciones se mezclaron con el medio apropiado, en el cual se inoculó previamente el microorganismo de prueba, después de la incubación se examinó por comparación visual turbidimétrica la cantidad de crecimiento del microorganismo en cada tubo de ensayo, comparando en cada caso la turbidez existente con la de los patrones de turbidez de McFarland. Este procedimiento se efectuó por duplicado. La menor concentración de muestra requerida para la inhibición de crecimiento visible será considerada la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Como controles positivos se utilizaron gentamicina para las bacterias G+ y G-, miconazol para los hongos filamentosos y nistatina contra la el hongo levaduriforme. Adicionalmente se preparó un control no tratado con muestra.

4.4 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO (I) DE LA CORTEZA DE *Alnus acuminata*.

4.4.1 Análisis cromatográfico del extracto hexánico (I).

El contenido metabólico secundario del extracto hexánico (I) se observó por cromatografía en capa fina de gel de sílice utilizando como sistema de disolventes hexano/acetato de etilo (97:03)

4.4.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico (I).

El extracto hexánico (I) (520 mg) fue adsorbido en el 100% de su peso en gel de sílice, y aplicado a una columna cromatográfica que contenía 20 g de gel de sílice. Se utilizaron como eluyentes para la columna mezclas de hexano y acetato de etilo en diferentes



proporciones de menor a mayor polaridad. Tanto las fracciones obtenidas como la proporción del sistema de elución se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico.

| Fracciones | Eluyente |
|------------|--------------------|
| 1-6 | hexano:AcOEt 95:05 |
| 7-26 | hexano:AcOEt 90:10 |
| 27-33 | hexano:AcOEt 85:15 |
| 34-36 | hexano:AcOEt 70:30 |

4.4.3 Aislamiento de 14-taraxeren-3-ona (**1**), 14-taraxeren-3-ol (**2**) y 3-acetoxi-14-taraxereno (**3**).

De la fracción 16 de la columna cromatográfica, eluída con hexano:acetato de etilo 90:10, se obtuvieron espontáneamente unos cristales de color blanco que fueron purificados por recristalización con una mezcla de hexano/acetato de etilo 9:1. El producto de la recristalización (12 mg) se aplicó en una columna cromatográfica abierta de gel de sílice (2.1 g), la cual fue trabajada con un sistema de eluyentes integrado por hexano-acetato de etilo 99:1%, separándose **1** (5 mg), **2** (2 mg) y **3** (2 mg). La identificación estructural de los componentes de los cristales se realizó mediante el análisis de sus constantes espectroscópicas (IR, RMN ^1H , ^{13}C y EM), las cuales se describen a continuación.

Compuesto **1**.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (**Espectro No. 1**): 3436, 2939, 2865, 1708, 1632, 1462, 1377, 1245, 1094.

RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) (**Espectro No. 2**): 5.56 (dd, $J= 8.1, 3.3$ Hz, H-15), 2.70 (ddd, $J= 16.0, 12.0, 7.2$ Hz, H-2a), 2.41 (ddd, $J= 16.0, 6.3, 3.6$ Hz, H-2b), 1.14 (s), 1.09 (s), 1.08 (s), 1.06 (s), 0.96 (s), 0.92 (s), 0.91 (s), 0.83 (s).



RMN-¹³C (CDCl₃) (**Espectro No. 3**): 217.6, 157.6, 117.2, 55.8, 48.8, 48.7, 47.6, 40.6, 38.9, 38.3, 37.7, 37.6, 37.5, 36.7, 35.8, 35.1, 34.1, 33.6, 33.3, 33.1, 29.9, 29.8, 28.8, 26.1, 25.6, 21.5, 21.3, 20.0, 17.4, 14.8 ppm.

CG (**Figura No. 19**): Pico 1, T. Ret. 1, 23.61 min

EMIE *m/z* (int. rel.) (**Espectro No. 4**): 424 [M⁺] (12), 409 (22), 300 (100), 285 (87), 204 (97), 189 (29), 149 (28), 133 (93), 107 (57), 95 (51)

Compuesto 2.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm⁻¹ (**Espectro No. 1**): 3436, 2939, 2865, 1708, 1632, 1462, 1377, 1245, 1094.

RMN-H¹ (CDCl₃, 300 MHz) (**Espectro No. 5**): 5.57 (dd, *J*= 7.8, 3.0 Hz, H-15), 3.25 (dd, *J*= 10.4, 5 Hz, H-3), 1.14 (s), 1.09 (s), 0.98 (s), 0.95 (s), 0.93 (s), 0.91 (s), 0.82 (s), 0.80 (s).

RMN-¹³C (CDCl₃) (**Espectro No. 6**): 117.0, 101.3, 79.0, 56.0, 49.3, 48.8, 41.3, 39.0, 38.8, 38.7, 38.0, 37.7, 37.6, 37.0, 36.0, 35.0, 34.0, 33.3, 33.1, 30.0, 29.8, 29.7, 29.0, 28.0, 27.0, 26.0, 21.0, 18.0, 17.0, 15.0 ppm.

CG (**Figura No. 19**): Pico 2, 24.02 min.

EMIE *m/z* (int. rel.) (**Espectro No. 7**): 426 [M⁺] (6), 411 (7), 302 (49), 287 (49), 204 (100), 189 (29), 147 (29), 135 (64), 121 (39), 107 (36).

Compuesto 3.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm⁻¹ (**Espectro No. 1**): 3436, 2939, 2865, 1708, 1632, 1462, 1377, 1245, 1094.

CG (**Figura No. 19**): Pico 4, 25.97 min

EMIE *m/z* (int. rel.) (**Espectro No. 8**): 468 [M⁺] (9), 454 (11), 344 (42), 329 (29), 269 (38), 204 (100), 189 (37), 135 (55), 133 (51), 107 (40).



4.4.4 Aislamiento del 3-oxo-lup-20(29)-eno (4)

De la fracción 1 de la columna cromatográfica, eluída con hexano:acetato de etilo 95:05, se obtuvo un precipitado de color blanco-amarillento el cual presentó las siguientes características espectroscópicas.

Compuesto **4**. IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (**Espectro No. 9**): 3433, 2925, 2854, 1729, 1706, 1640, 1458, 1380.

RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) (**Espectro No. 10**): 5.5 (m, H-12), 4.68 (d, $J= 2.4$ Hz, H-29a), 4.67 (d, $J= 2.4$ Hz, H-29b), 3.18 (dd, $J= 11.1, 5.3$, H-3), 2.36 (m, H-19), 1.67 (s), 1.25 (s), 1.02(s), 0.96 (s), 0.94 (s), 0.82 (s), 0.78 (s), 0.76 (s).

RMN- ^{13}C (CDCl_3) (**Espectro No. 11**): 151.0, 109.0, 79.0, 55.0, 50.0, 48.3, 48.0, 43.0, 42.8, 40.0, 38.8, 38.6, 38.0, 37.7, 37.1, 36.0, 34.0, 29.8, 29.7, 28.0, 27.0, 25.0, 21.0, 19.0, 18.3, 18.0, 16.1, 16.0, 15.0, 14.5 ppm.

CG (**Figura No. 20**): Pico 2, 20.27 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro No. 12**): 424 [M^+] (30), 409 (20), 313 (27), 245 (34), 218 (25) 205 (100), 189 (50), 149 (37), 121 (65), 109 (76), 95 (71)

4.4.5 Aislamiento de 3 β ,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5)

De la fracción 15-18, de la columna cromatográfica eluída con hexano:acetato de etilo 90:10, se obtuvo un compuesto de color blanco que fue purificado por recristalización con metanol. La identificación estructural se realizó mediante el análisis de sus siguientes constantes espectroscópicas.



Compuesto **5**. IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (**Espectro No. 13**): 3417 (ancho), 2922, 2852, 1710, 1643, 1454, 1379, 1260, 1027.

RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) (**Espectro No. 14**): 4.68 (d, $J= 2.4$, H-29a), 4.58 (d, $J= 2.4$ H-29b), 3.80 (d, $J= 10.2$, H-28a), 3.33 (d, $J= 10.5$, H-28b), 3.19 (dd, $J= 11, 5.3$, H-3), 3.0 (m, H-19), 1.68 (s, H-30), 1.02 (s, H-27), 0.97 (s, H-26), 0.82 (s, H-25), 0.76 (s, H-24).

RMN- ^{13}C (CDCl_3) (**Espectro No. 15**): 150.5, 109.7, 79.0, 60.6, 55.3, 50.4, 48.8, 47.8, 42.7, 40.9, 38.9, 38.7, 37.3, 37.2, 34.2, 34.0, 29.8, 29.7, 29.2, 28.0, 27.4, 27.0, 25.2, 20.8, 19.1, 18.3, 16.1, 16.0, 15.3, 14.8 ppm.

CG (**Figura No. 21**): Pico 9, 27.20 min

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro No. 16**): 442 [M^+] (2), 411 (7), 288 (3), 235 (11), 203 (30), 189 (38), 147 (25), 135 (41), 121 (50), 109 (60), 69 (82), 55(100)

4.5 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO BUTANÓLICO DE LA CORTEZA DE *A. acuminata*.

4.5.1 Análisis cromatográfico del extracto butanólico

El contenido metabólico secundario del extracto hexánico se observó por cromatografía en capa fina de gel de sílice utilizando como sistema de disolventes hexano - acetato de etilo (25:75)

4.5.2 Aislamiento e identificación de la mezcla de azúcares peracetilados tetraacetil α -D-xilosa (**6**), pentaacetil D-fructosa (**7**) y penta-*O*-acetil α -D-glucopiranososa (**8**).

El extracto butanólico (300 mg) fue sometido a un proceso de acetilación y el producto de la reacción fue procesado como se indica en el punto 4.2.2.1. El producto de la acetilación



del extracto butanólico (**Figura 9**), se estudió por el método de espectroscopía de masas acoplado a cromatografía de gases; se logró identificar a tres de los compuestos que componen al extracto como sus correspondientes derivados acetilados, los cuales presentaron las siguientes constantes espectroscópicas.

Compuesto 6.

CG (**Figura No. 22**): Pico 6, 11.77 min.

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro No. 17**): 259 [M^+ -CH₃OCO-] (1), 170 (55), 157 (23), 145 (8), 128 (100), 115 (58), 103 (43), 97 (26), 82 (41), 69 (42).

Compuesto 7.

CG (**Figura No. 22**): Pico 7, 13.03 min.

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro No. 18**): 317 [M^+ -CH₃OCOCH₂-] (2), 289 (6), 275 (27), 233 (6), 215 (9), 187 (64), 170 (45), 145 (16), 127 (78), 101 (100), 85 (95), 73 (53).

Compuesto 8.

CG (**Figura No. 22**): Pico 8, 13.13 min.

EMIE m/z (int. rel.) (**Espectro No. 19**): 242 [M^+ -(2 x CH₃COO-, 2 x CH₃-)] (15), 215 (5), 200 (23), 182 (8), 168 (6), 157 (47), 140 (28), 115 (100), 104 (33), 98 (81), 85 (17), 73(26).

4.5.3 Aislamiento del 2',3',4',6'-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**9**).

El residuo de la reacción de acetilación se aplicó a placas preparativas de gel de sílice de 20 x 20 cm y se eluyó con un sistema hexano:AcOEt:acetona 3:4:3, en las cuales se distinguieron 4 bandas con tiempos de retención diferentes, las cuales se separaron de la placa y extrajeron con acetona. Tanto las fracciones obtenidas de las bandas como el rF que presentaba cada una en la placa preparativa se presentan en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Fraccionamiento cromatográfico del extracto butanólico.

| Fracción | Rf | Peso (mg) |
|----------|------|-----------|
| 1 | 0.22 | 15 |
| 2 | 0.32 | 49 |
| 3 | 0.51 | 56 |
| 4 | 0.67 | 73 |

De la fracción 4 (**Tabla 8**) obtenida de la manera descrita en el punto anterior, se obtuvo un sólido blanco que fue purificado por una recristalización con metanol, el producto obtenido mostró las siguientes constantes espectroscópicas a partir de las cuales fue identificado.

Compuesto **10**. IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (**Espectro No. 20**): 3413 (ancho), 2958, 2937, 2868, 1719, 1463, 1377, 1161, 1077, 1027.

RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) (**Espectro No. 21**): 5.18 (t, $J= 9.3$, 9.3 H-3'), 5.05 (t, $J= 9.6$, H-4'), 4.93 (dd, $J= 9.3$, 8.1, H-2'), 4.57 (d, $J= 7.8$, H-28b), 4.23 (dd, $J= 12$, 4.8, H-6'a), 4.09 (dd, $J= 12$, 2.4, H-6'b), 3.65 (ddd, $J= 9.9$, 4.8, 2.4 H-5'), 2.07 (s, H-27), 2.05 (s, H-26), 2.02 (s, H-25), 2.00 (s, H-24).

RMN- ^{13}C (CDCl_3) (**Espectro No. 22**): 170.7, 170.4, 169.4, 169.3, 140.3, 122.2, 99.6, 80.1, 72.9, 71.6, 71.4, 68.5, 62.1, 56.7, 56.0, 50.1, 45.8, 42.3, 39.7, 38.9, 37.2, 36.7, 36.1, 33.9, 31.9, 31.8, 29.7, 29.4, 29.1, 28.2, 26.0, 24.3, 23.0, 21.0, 20.8, 20.7, 20.6, 19.8, 19.3, 19.0, 18.8, 12.0, 11.8 ppm.



5. RESULTADOS Y DISCUSION

Como se mencionó en la justificación, dentro de las plantas medicinales de mayor uso en nuestro país, *Alnus acuminata* es muy apreciada por la propiedad anti-inflamatoria que exhiben los preparados de la corteza.

Existen además, antecedentes de pruebas biológicas anti-inflamatorias realizadas a los extractos de diferentes polaridades de la planta (hexánico, clorofórmico y butanólico), en los que se han obtenido resultados positivos (Gómez, 2007; Rovelo, 2002), por lo que fueron objeto de análisis en otros modelos biológicos y posteriormente desde un punto de vista químico es importante el estudio químico, dirigido éste último a la búsqueda e identificación de los principios en los que pudiera recaer la actividad biológica de la planta.

5.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Alnus acuminata*.

5.1.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos hexánico (I), clorofórmico (I) y metanólico (obtenidos por método I) por la técnica de difusión en agar en capa delgada.

En la **Tabla 9** se muestran los resultados obtenidos de la prueba mencionada para cada uno de los microorganismos y los extractos, en la **Figura 11** se tiene un ejemplo de los halos de inhibición medidos.



Tabla 9. Resultados de la determinación de actividad antimicrobiana por el método por la técnica de difusión en agar en capa delgada. Se muestran los promedios en cm de los diámetros de los distintos halos de inhibición, las concentraciones mostradas corresponden a mg de extracto por disco.

| Microorganismo | Extracto metanólico | | Extracto clorofórmico | | Extracto hexánico | |
|-----------------------------------|---------------------|-------|-----------------------|-------|-------------------|-------|
| | 0.5mg | 1.0mg | 0.5mg | 1.0mg | 0.5mg | 1.0mg |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1,50 | 1,90 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Candida albicans</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Tricophyton mentagrophytes</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,77 | 2,0 |
| <i>Microsporium canis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



Figura 11. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y hexánico. Se marca con color rojo el halo de inhibición producido por el extracto metanólico en un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (izquierda) y del extracto hexánico en un cultivo de *Tricophyton mentagrophytes* (derecha). En ambos casos se marca la concentración mayor (1 mg).

Los resultados correspondientes a la concentración de extracto de 0.1mg no se presentan en la **Tabla 9**, pues no se observó un halo de inhibición. En la **Figura 11** (extracto hexánico), se puede observar una zona de crecimiento de color un poco más claro alrededor del disco correspondiente a la concentración de 0.1mg (marcada con el número 3) que en el resto del crecimiento; esto no se consideró como un halo de inhibición pues una zona clara similar se presentó alrededor del disco del control negativo (marcada con el número 4), además de que sí existía crecimiento del microorganismo en dicha zona.



Uno de los objetivos del trabajo es determinar si existe actividad antimicrobiana por parte de alguno de los extractos de la planta, hacia microorganismos G+, particularmente *Staphylococcus aureus*, el cual frecuentemente se asocia a problemas de vías respiratorias que cursan con inflamación de ganglios, que es uno de los usos de los preparados de *A. acuminata*. Observando los resultados de la **Tabla 9**, este microorganismo no fue afectado en su crecimiento por alguno de los extractos. Por lo anterior, se decidió volver a extraer la corteza de *A. acuminata* por el método de partición de un extracto total, para de esa manera disminuir la presencia de compuestos polares y aumentar la de otros que fueran activos, pero se encuentran en menor concentración en el extracto. En la **Parte Experimental** se detalló este procedimiento mencionado (**Figura 9**).

5.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de dilución en agar de los extractos hexánico (II), de AcOEt, clorofórmico (II) y butanólico.

En esta segunda determinación de actividad antimicrobiana no se incluyó al microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que no se contaba con la cepa al momento de realizar el estudio, pero se incluyó a otras especies representativas tales como *Salmonella tiphy* y *Proteus mirabilis*.

Tabla 10. Determinación de la concentración mínima inhibitoria por la técnica de dilución en agar. El resultado se presenta en miligramos por mililitro.

| Extracto | Butanólico | AcOEt | Clorofórmico | Hexánico |
|-----------------------------------|------------|-------|--------------|----------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | >3 | 0.75 | 0.75 | 0.375 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | >3 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| <i>Escherichia coli</i> | >3 | 1.5 | >3 | >3 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | >3 | 1.5 | >3 | >3 |
| <i>Salmonella tiphy</i> | >3 | 1.5 | >3 | >3 |
| <i>Candida albicans</i> | >3 | 0.75 | >3 | >3 |
| <i>Tricophyton mentagrophytes</i> | 3 | 3 | 0.75 | >3 |
| <i>Tricophyton rubrum</i> | 3 | 3 | 0.75 | >3 |



En la **Tabla 10** se muestran los resultados de CMI obtenidos para cada uno de los microorganismos y los extractos evaluados. Se puede observar que existe actividad en contra de los hongos filamentosos, ambos pertenecientes al género *Tricophyton*, sin embargo ésta se presenta en el extracto clorofórmico (II) y no en el hexánico (II), como ocurrió en las pruebas realizadas con la técnica de difusión en agar en capa delgada. Esto debido probablemente a que se utilizaron técnicas de extracción diferentes, sin embargo, es probable que la actividad se deba en ambos casos al mismo compuesto o compuestos, dado que se encuentran en extractos de polaridades similares.

La actividad antimicrobiana, mostrada contra *Staphylococcus aureus* por los distintos extractos obtenidos de la planta en la prueba realizada con la técnica de dilución en agar, no fue corroborada en los resultados obtenidos con la prueba de difusión en agar en capa delgada. Tal efecto se podría deber a que en los extractos obtenidos por partición, que se utilizaron en la prueba por dilución, el agua de extracción separó y ayudó a eliminar componentes no activos, lo que promovió el aumento de la concentración de los compuestos activos, haciendo que fuera posible observar dicha actividad con la prueba realizada.

5.2 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO (I) DE LA CORTEZA DE *A. acuminata*.

En las cromatografías en capa fina de los extractos hexánico (I), clorofórmico (I) y metanólico obtenidos por el método 1, el extracto hexánico y el metanólico mostraron un contenido abundante de metabolitos secundarios. Por las razón anterior, y dado que el extracto hexánico había presentado una importante actividad antimicrobiana, dicho extracto fue tomado como punto de partida del estudio químico de la planta.

5.2.1 Aislamiento e identificación estructural de 14-taraxeren-3-ona (1).



El extracto hexánico (I) se sometió en una columna cromatográfica preparativa de gel de sílice, empleando como sistema de eluyentes mezclas de hexano-acetato de etilo en mezclas de polaridad ascendente. De la fracción 16 del fraccionamiento cromatográfico (hexano-acetato de etilo (9:1) se obtuvieron unos cristales que al ser analizados por CCF, mostraron ser una mezcla de tres componentes con valores de tiempos de retención muy cercanos. El espectro en el infrarrojo de esta fracción presentó absorciones para grupos carbonilo de cetona en 1708 cm^{-1} , para grupos hidroxilo en 3435 cm^{-1} , una banda intensa correspondiente a la unión carbono-oxígeno de hidroxilo en 1094 cm^{-1} que comprueba la señal anterior, dos bandas intensas en 2939 y 2865 cm^{-1} típicas para la vibración de grupos carbono-hidrógeno alifáticos, y otras bandas en 1462 , 1377 y 1245 cm^{-1} que corroboran la presencia de grupos metilo, metileno y metino en la molécula.

El espectro de RMN- ^1H evidenció la presencia de señales singulete en la zona comprendida entre 0.8 y 1.7 ppm de probables metilos angulares en una estructura terpenoide. El cromatograma de gases de esta fracción, corroboró la existencia de tres componentes cuyos espectros de masas mostraron pesos moleculares de 424, 426 y 468, y en todos ellos fue evidente un pico base en m/z 204, y otros más en 300 y en 302, que según la literatura se manifiestan en estructuras triterpenoides con esqueleto de taraxerano (Ageta *et al.*, 1983).

La mezcla anterior fue separada en sus componentes por cromatografía en columna semi-micro preparativa. El compuesto **1** fue obtenido con el menor tiempo de retención y presentó 30 señales en el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 5), de las cuales, la de δ 220 se asignó a un grupo carbonilo de cetona; un grupo vinilo trisustituído se apreció por las señales en 157.6 (carbono cuaternario) y 117.2 (carbono doblete) ppm. 8 señales de metilo unidos a carbono cuaternario fueron confirmadas tanto en el espectro de RMN de hidrógeno como el de carbono-13 en el rango entre 0.83 y 1.09 ppm (14.8 y 36.0 ppm). De acuerdo al espectro DEPT, se encuentran en la molécula 8 metilos, 10 metilenos, 3 metinos y por diferencia con el resto de señales observadas en el espectro normal de carbono 13, 9 carbonos cuaternarios, lo que provee una fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$, congruente con un



IDH de 7. Descontando a este valor las insaturaciones correspondientes a la cetona y al doble enlace encontrados, la estructura debe contener 5 ciclos. Por otra parte, las señales doblote de doble de dobles, localizados en 2.41 y en 2.70 ppm, se asignaron a los hidrógenos vecinos al grupo carbonilo y la señal en 5.56 ppm como un doblote de dobles que integró para un hidrógeno, se asignó a un grupo metino de doble ligadura. Integrando a lo anterior las observaciones del espectro de masas, se concluyó que la estructura es consistente con la de la 14-taraxeren-3-ona, y esto se confirmó al comparar nuestros resultados con los reportados en la literatura (Nobuko *et al.*, 1987; Elsevier, 1940). La estructura de este compuesto se encuentra en la **Figura 12**.

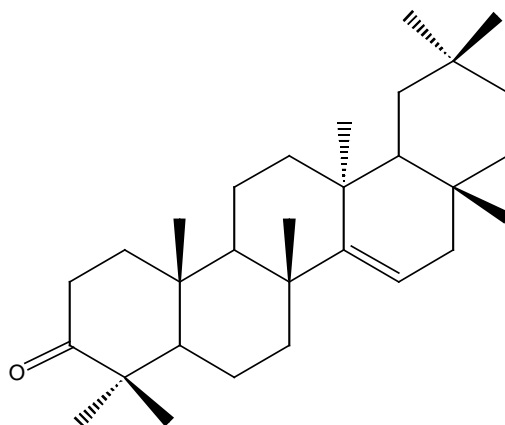


Figura 12. Estructura de la 14-taraxeren-3-ona.(1)

5.2.2 Aislamiento e identificación estructural de 14-taraxeren-3-ol (2)

El compuesto **2**, de mayor polaridad que el compuesto **1** (dado su tiempo de retención en la columna cromatográfica), presentó similitudes espectroscópicas con este último compuesto, como lo fueron las 30 señales en el espectro de carbono 13; también fue evidente la presencia de un doble enlace trisustituído en la misma zona del espectro que en el caso del compuesto **1**, en 158.1 ppm (carbono singulete) y en 116.8 ppm (carbono doblote). El espectro DEPT mostró señales para 8 metilos, 10 metilenos y cuatro metinos, uno adicional al del compuesto **1**. Por otra parte, el espectro de carbono 13 no mostró la señal del carbonilo y apareció una señal para carbono base de un oxígeno en 79.1 ppm.



El espectro de RMN de hidrógeno corroboró la presencia del alcohol como un doble de dobles en 3.25 ppm, y por otra parte la doble ligadura como un doble de dobles en 5.57 ppm y los 8 metilos angulares de la molécula en la zona de 0.8 a 1.14 ppm. El espectro de masas, mostró un ión molecular de 426 umas, y por la observación de los fragmentos principales en 204 (pico base) y 302, se asignó al compuesto **2** la estructura de un triterpenoide del tipo taraxerano como en el caso del compuesto **1**. Al integrar todos los resultados espectroscópicos y compararlos con los reportados en la literatura (Nobuko *et al.*, 1987), se infirió para este compuesto la estructura del 14-taraxeren-3-ol, cuya estructura se encuentra en la **Figura 13**.

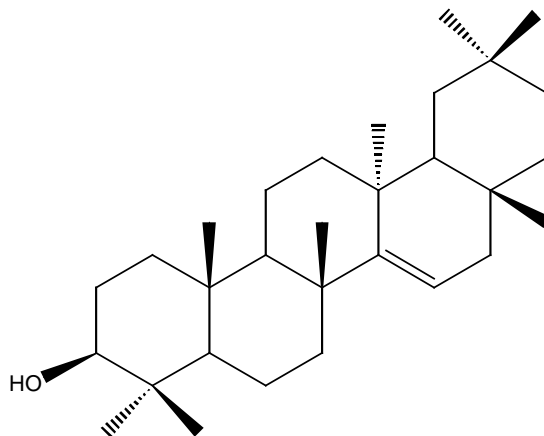


Figura 13. Estructura de la 14-taraxeren-3-ol (**2**).

5.2.3 Aislamiento e identificación estructural de 3-acetoxi-14-taraxereno (**3**)

La estructura del compuesto **3** se infirió al observar la fragmentación de su molécula en el espectro de masas, obtenido de su separación por cromatografía de gases de la fracción 16. En éste, se observa la pérdida de un fragmento en m/z 43. Los fragmentos correspondientes a los del 14-taraxeren-3-ona en 204 y en 300, se repiten, pero en el compuesto **3** este último con 44 umas adicionales.



El ión molecular registró un valor de 468, con una diferencia de peso de 42 umas con respecto del compuesto **2**, que significaría que el grupo oxhidrilo de este compuesto estaría sustituido por un acetil-oxi, por lo que la estructura propuesta para este compuesto es la del 3-acetiloxi-14-taraxereno. La estructura de este compuesto se esquematiza en la **Figura 14**.

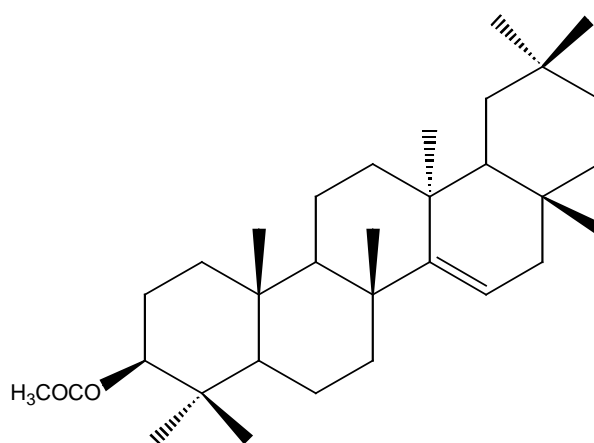


Figura 14. Estructura del 3-acetiloxi-14-taraxereno. (**3**)

5.2.4 Aislamiento e identificación de 3-oxo-lup-20(29)-eno (**4**)

De la fracción 1 del fraccionamiento cromatográfico se obtuvo un precipitado que al ser analizado por CCF mostró ser una mezcla de 3 compuestos con valores de tiempo de retención muy cercanos y que por la presencia de señales singulete intensas en la zona del espectro de RMN-¹H entre 1.5 y 1.7 ppm, se evidenció la presencia de terpenoides. Por análisis de cromatografía de gases de esta fracción, se confirmó la presencia de tres compuestos cuyos espectros de masas presentaban pesos moleculares de 424, 426 y 468, siendo muy mayoritario en la mezcla, el segundo componente.

La fragmentación y el peso molecular de los compuestos cuyos pesos son 424 y 468 correspondieron con los de los compuestos **1** y **3**, aislados de los cristales obtenidos de la fracción 16. La fragmentación del compuesto cuyo peso es 426 (**4**), mostró un pico base de



205 y otra fragmentación en m/z 218, típicas para la ruptura de estructuras triterpenoides con esqueleto de lupano y un grupo cetona en C-3 (Yamaguchi, 1970). El espectro en el infrarrojo de esta mezcla mostró señales para grupos oxidrilo en 3433 cm^{-1} y adicionalmente para grupos con carbono-hidrógeno alifáticos (CH_3 , CH_2 , CH), así como una señal en 1706, de una cetona.

El espectro de RMN de hidrógeno mostró dos señales dobles en 4.68 y 4.67 ppm acopladas entre sí por una constante de 2.4 Hz. El espectro de RMN de carbono 13 presentó las señales correspondientes a esos hidrógenos en 151 y 109 ppm, de un carbono singulete y el otro doblete (DEPT), respectivamente. El espectro de RMN de hidrógeno mostró señales para 7 metilos alifáticos, presentes también en el espectro de carbono trece, de los cuales uno, de acuerdo a su desplazamiento (1.67), está unido al vinilo terminal. Este arreglo está presente en los triterpenoides de tipo lupano. El espectro DEPT contribuyó al cálculo de 11 carbonos de metileno y 5 metinos. Por lo anterior y considerando su peso molecular, se asignó a este compuesto la estructura del 3-oxo-lup-20(29)-eno. Esta propuesta se confirmó por comparación de las características espectroscópicas encontradas con las de la literatura (Uddin, 1994). La estructura de este compuesto se encuentra esquematizada en la **Figura 15**.

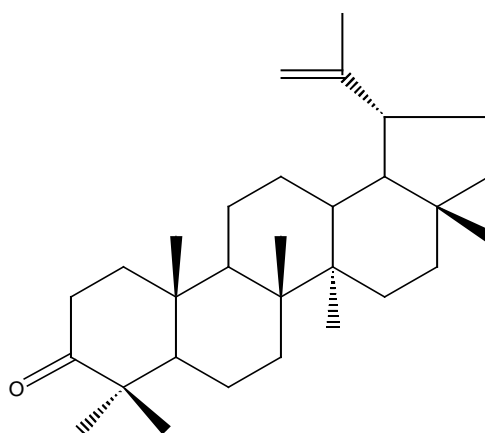


Figura 15. Estructura del 3-oxo-20(29)-lupeno. (4)



5.2.5 Aislamiento e identificación de 3 β ,28-dihidroxilup-(20)29-eno (**5**).

De las fracciones 15-18, eluídas con hexano:acetato de etilo 90:10, se obtuvo un compuesto de color blanco que fue purificado por recristalización con metanol. El análisis por RMN de carbono 13, mostró 30 señales de un probable triterpenoide, de las cuales las dos a campo mas bajo (δ_{13C} 150.5, carbono singulete y δ_{13C} 109.7, carbono doblete) se asignaron a carbonos de tipo vinílico terminal disustituído, y a su resonancia en el espectro APT (C-29) y también por su resonancia en hidrógeno, como dos dobletes localizados en 4.68 y 4.58 con constantes de acoplamiento gem de 2.4 Hz cada uno (H-29a y H-29b).

El espectro en el infrarrojo mostró una señal intensa en 3417 cm^{-1} , asignada a hidroxilos en la molécula los cuales fueron evidentes tanto en el espectro de RMN de carbono 13 (δ_{13C} 79.0, carbono doblete y δ_{13C} 60.6, carbono triplete) y en el de RMN protónica, presentando señales de hidrógenos unidos a carbonos base de oxígeno (59 ppm) en 3.8 (señal doble) acoplada con la de 3.33 (señal doble) compartiendo el mismo valor de constante de acoplamiento (10.2 y 10.5 Hz). La multiplicidad y las constantes de acoplamiento de estas dos señales, permitieron la adjudicación de señales geminales asignadas a hidrógenos del carbono 28 como alcohol primario. Por otra parte, la señal restante para el carbono base de oxígeno (77.8 ppm) con señales en RMN de hidrógeno de un doble de dobles (3.19 ppm) con constantes de acoplamiento de 11 y 5.3, se asignó al hidrógeno en posición 3 de un triterpenoide; su desplazamiento químico corrobora su posición en un carbono base de oxígeno. Las señales a campo mas alto que se presentaron como singuletes intensos se asignaron a 6 metilos, cinco de los cuales de tipo angular y uno unido al grupo vinílico terminal en 1.68 ppm (H-30). Este arreglo, como en el caso del compuesto **4**, es típico para triterpenoides con esqueleto del lupano.

El espectro de masas de este compuesto dio un peso molecular de 442 que ajusta una fórmula molecular (calculada también por las señales en los espectros de RMN) de $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$, con un IDH de 6, que se justifica por un doble enlace y 5 ciclos, por lo que la



estructura del compuesto **5** (**Figura 16**) corresponde a la betulina (3β , 28 dihidroxi-lup-20(29)-eno).

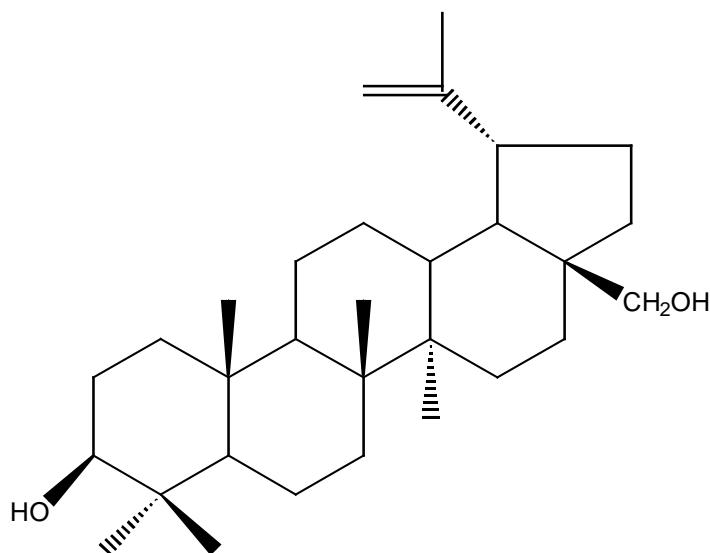


Figura 16. Estructura del $3\beta,28$ -dihidroxi-20(29)-lupeno (**5**).

5.3 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO BUTANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Alnus acuminata*.

Tal y como se mencionó anteriormente, el extracto metanólico de la corteza de *A. acuminata*, obtenido por el método I, mostró un contenido abundante de metabolitos secundarios. A fin de facilitar el estudio químico, se determinó trabajar con el extracto butanólico obtenido por el método II (Lunardi *et al.*, 2001), por tratarse de un extracto de polaridad similar a la del metanólico, pero del cual se eliminaron sustancias polares probablemente presentes, tales como taninos.

5.3.1 Análisis cromatográfico del extracto butanólico

El extracto butanólico de la corteza, presentó un complejo y muy polar contenido metabólico, por lo que fue sometido a un proceso de acetilación para tratar de separar sus



posibles componentes. El producto de acetilación (270 mg) fue aplicado en placas cromatográficas preparativas, y las 4 bandas separadas y extraídas del adsorbente con acetona, dieron como resultado mezclas complejas de metabolitos de polaridad menor que las materias primas y fueron analizadas por cromatografía de gases/espectrometría de masas (**Figura No. 22**). De este análisis pudieron identificarse a los azúcares tetraacetil α -D-xilosa (**6**), pentaacetil D-fructosa (**7**) y penta-*O*-acetil α -D-glucopiranososa (**8**); en el caso de esta última, no es posible distinguir si se trata efectivamente del producto acetilado de la α -D-glucopiranososa, o de su isómero la α -D-manopiranososa pues presentan los mismos picos con intensidades semejantes en el espectro de masas. Las estructuras de los azúcares peracetilados se esquematizan en la **Figura 17**, en el caso del compuesto **8**, se incluye la estructura tanto de la penta-*O*-acetil α -D-glucopiranososa como de la penta-*O*-acetil α -D-manopiranososa.

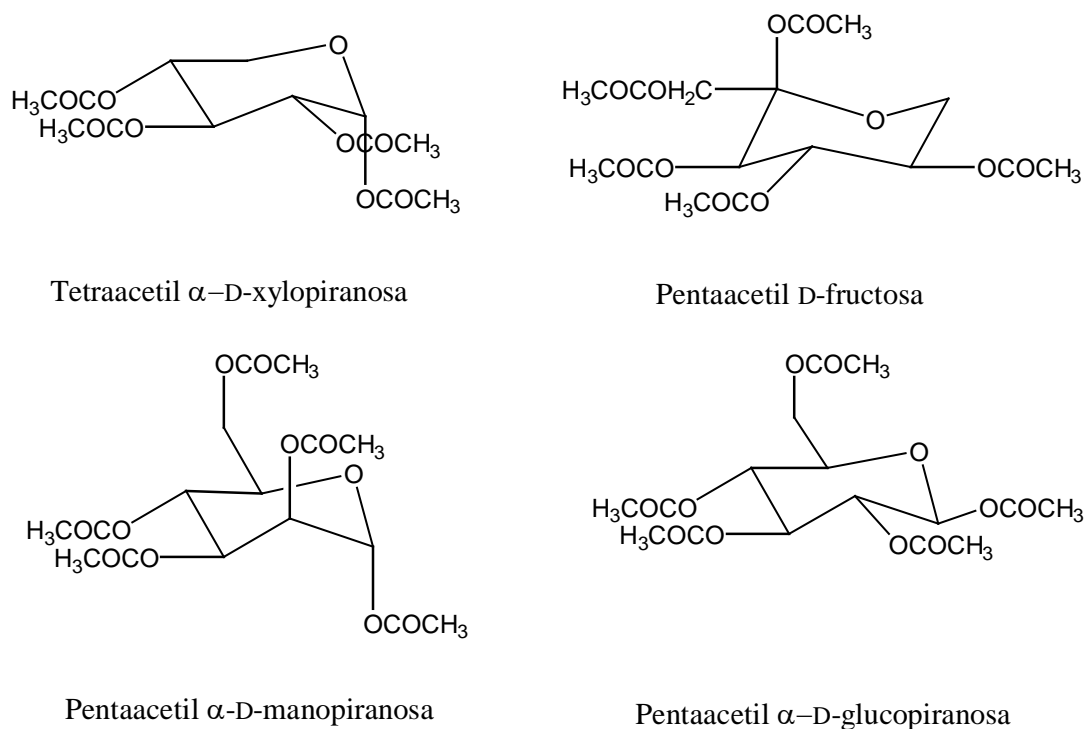


Figura 17. Estructuras de los azúcares identificados en el extracto butanólico.



Cabe señalar que aunque el ión molecular de los compuestos mencionados no fue aparente en los correspondientes espectros de masas (**Espectros 21, 22 y 23**) en ninguno de los tres casos, la biblioteca del espectrómetro de masas registra la misma situación para todos y cada uno de los azúcares. En el caso del compuesto **6**, el fragmento de mayor peso que presenta el espectro es de 259 uma, esto y la ausencia del ión molecular, se explican por la pérdida de un ión acetilo (CH_3COO^- , 59 uma), siendo la suma de ambos fragmentos 318 uma que es el peso que se esperaría de la molécula sin fragmentar. Un razonamiento similar se puede aplicar a los compuestos **7** y **8**; en el caso del primero, el fragmento de mayor peso es de 317 uma, mientras el ión molecular debería pesar 390 uma; la diferencia de 73 unidades se explica por la pérdida de un ión acetil-oxi-metileno ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2^-$); en el caso del compuesto **8**, la diferencia de 148 unidades entre el ión molecular y el fragmento mayor (390 y 242 uma respectivamente), se explicaría por la pérdida de dos grupos acetoxi (CH_3COO^-) y dos metilos (CH_3^-).

5.3.2 Aislamiento e identificación del 2',3',4',6'-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**9**).

De la fracción 4, obtenida del fraccionamiento por placa preparativa del extracto butanólico acetilado, se obtuvo un precipitado blanco que fue purificado por recristalización en metanol. El análisis por RMN de carbono 13, mostró 43 señales. Por su desplazamiento, las señales en 21.0, 20.8, 20.7 y 20.6 ppm, se asignaron a hidrógenos de metilos de acetilo, esto se confirmó en el espectro por RMN de hidrógeno, en el que las señales correspondientes (2.07, 2.05, 2.02 y 2.00 ppm) se presentaron como singuletes. Asimismo fue evidente la presencia de un doble enlace trisustituído por la señal que aparece en 5.35 ppm (122.1 y 140.3 ppm) que se asignó a un hidrógeno de tipo vinílico; en 3.48 se encuentra un multiplete que integró para un hidrógeno (80.0 ppm) asignado a un hidrógeno de carbono base de oxígeno. En la zona comprendida entre 5.2 a 3.67 se apreciaron señales bien definidas que se asignaron a una parte glicosilada dentro de la molécula. Las señales (6) entre 0.67 y 1.08 ppm, se aprecian como singuletes y dobletes de gran intensidad que sugieren a grupos metilo unidos a carbonos cuaternarios y terciarios.



El espectro en el infrarrojo mostró absorciones para grupos hidroxilo en 3413 cm^{-1} , metilos, metilenos y metinos en $2958, 2937, 1463$ y 1377 , carboxilo de éster en 1719 , y vibración de carbono-oxígeno en 1077 cm^{-1} . De acuerdo al número y tipo de carbonos observados en el espectro de carbono 13, se infirió para este compuesto la estructura de un esteroide, particularmente de tipo esteroide glicosilado, lo cual se comprobó al comparar nuestros resultados con las características espectroscópicas correspondientes a las del $2',3',4',6'$ -*O*-acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**9**) (Fuentes *et al.*, 2004; <http://pr.hec.gov.pk>), cuya estructura se muestra en la **Figura 18**.

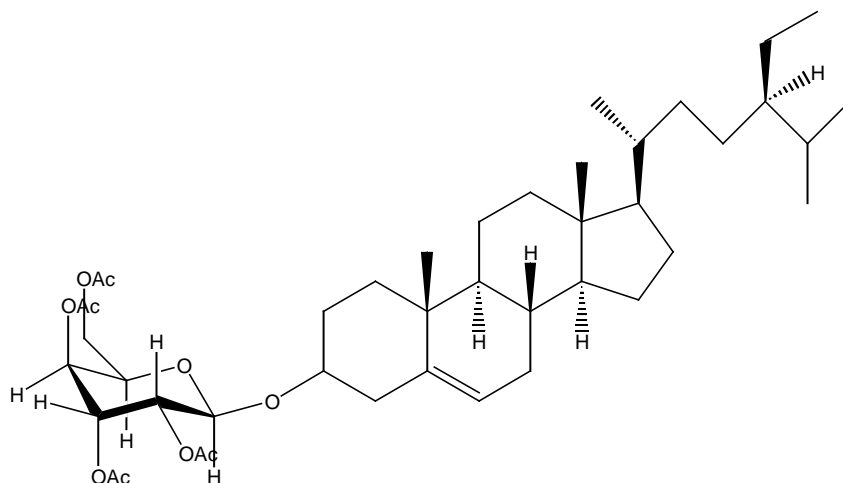


Figura 18. Estructura del $2',3',4',6'$ -*O*-acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**9**).



6. CONCLUSIONES

1. De los 7 extractos orgánicos preparados de la corteza de *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht.) Furlow, los extractos hexánico (I) y metanólico mostraron actividad antimicrobiana frente a *Tricophyton mentagrophytes* y *Pseudomonas aeruginosa* de manera respectiva en un ensayo realizado por la técnica de difusión en agar en capa delgada. El extracto hexánico (II) mostró una importante actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (CMI) en un estudio realizado por la técnica de dilución en agar, mientras que el clorofórmico (II) lo hizo frente a *Tricophyton mentagrophytes* (CMI) y *Tricophyton rubrum* en el mismo estudio. Estos resultados permiten corroborar en parte, las actividades biológicas que se le atribuyen a esta planta, para el tratamiento de escrófulas.
2. Del fraccionamiento químico del extracto hexánico (I) por cromatografía en columna de gel de sílice, se aislaron los triterpenoides pentacíclicos: 14-taraxeren-3-ona (1), 14-taraxeren-3-ol (2), 3-acetoxi-14-taraxereno (3), 3-oxolup-(20)29-eno (4) y 3 β ,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5), cuya identificación estructural se basó en sus características espectroscópicas y espectrométricas, y en la literatura existente.
3. Del fraccionamiento químico del producto de la acetilación del extracto butanólico, se aislaron al glucósido 2',3',4',6'-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (9) y a un grupo de azúcares: tetraacetil α -D-xilosa (6), pentaacetil D-fructosa (7) y penta-*O*-acetil α -D-glucopiranososa (8). La identificación estructural de estos compuestos se basó en sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas, y comparando estos datos con lo reportado en la literatura.
4. Los metabolitos secundarios aislados de la especie *Alnus acuminata* sbsp. *Arguta* (Schlecht.) Furlow, son del tipo de metabolitos encontrados en otras especies del mismo género.



7. PERSPECTIVAS

Dados los resultados que se obtuvieron acerca de la actividad antimicrobiana de los extractos de *A. acuminata*, sería recomendable ampliar las pruebas biológicas hacia un mayor número de microorganismos, como un medio para detectar otras probables actividades que pudieran ser de interés, así como realizar un estudio químico biodirigido a fin de aislar y determinar la estructura de la sustancia o sustancias responsables de dicha actividad.

Respecto al estudio químico de la planta, se sugiere trabajar en el fraccionamiento de extractos de polaridad media para el aislamiento y elucidación estructural de un mayor número de metabolitos secundarios.



BIBLIOGRAFÍA

- Ábrego A. A. L. (2005). Aislamiento e identificación estructural de compuestos con actividad antimicrobiana de la especie *Acacia farnesiana* Willd. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ageta H., Arai Y. (1983). Fern constituents: pentacyclic triterpenoids isolated from *Polypodium niponicum* and *P. formosanum*. *Phytochemistry*, **22**, 1801-1808.
- Alanís A. D., Calzada F., Cervantes J.A., Torres J., Cevallos G.M. (2005). Antibacterial properties of some plants used in mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 153-157.
- Demirci, B., Can-Baser H. (2000). Betulenols from *Betula* species. *Planta Medica*, **66**, 490-493.
- Dewick P. M. (2002). Medicinal Natural Products, 2ª Edición, John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra. Pp 167-231.
- Duke A. J. (1992). HandBook of Phytochemical Contituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants. Boca Raton, Florida USA, CRC Press. Pp 123-456.
- Elsevier's Encyclopedia of Organic Chemistry (1940), Holanda, Vol. 14. pp 532-533.
- Evans T. (1985). Farmacognosia, Editorial Interamericana-McGraw Hill, Barcelona, España. Pp 145-148.



- Fuentes G. M., Hernández E. M. (2004). Estudio fitoquímico de las semillas de *Glaricidia sepium* (Leguminosae) y del extracto metanólico de la raíz de *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Galgon T., Höke D., Dräger B. (1999). Identification and quantification of betulinic acid. *Phytochemical Analysis*, **10**, 187-190.
- García P. N., Rodríguez R. E. (2006). Pruebas de identidad y pureza para el control de calidad a la droga cruda de *Alnus acuminata* (Schlecht.) Furlow sbsp *arguta*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gómez V. J. C. (2007). Ensayos de actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de diferentes polaridades de *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht) Furlow. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hanawa F., Shiro M., Yoshioki H. (1997). Heartwood constituents of *Betula maximowicziana*. *Phytochemistry*, **45**, 589-595.
- Harborne B. (1985). Dictionary of Organic Compounds, 5^a Edición, Marcel Dekker, Nueva York, EU. Pp 276-320.
- Huguet A., Recio M., Máñes S., Giner R., Ríos J. (2000). Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *European Journal of Pharmacology*, **410**, 69-81.



- Jin W., Kai X. F., Na M., Lee J. J., Bae K. (2007); Triterpenoids and diarylheptanoids from *Alnus hirsuta* inhibit HIF-1 in AGS cells. *Archives of Pharmaceutical Research*, **30**, 412-418.
- Keinänen M., Julkunen-Tiitto R. (1998). High-Performance Liquid Chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *Journal of Chromatography*, **793**, 370-377.
- Klischies M., Zenk M. (1978). Stereochemistry of C-methylation in the biosynthesis of rhododendrin in *Alnus* and *Betula*. *Phytochemistry*, **17**, 1281-1284.
- Lunardi I., Peixoto J. L. B., da Silva C.C., Shuquel I. T. A., Basso E. A., Vidotti G. J. (2001). Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, **12**, 180-183.
- Mañes S., Recio. C., Giner R., Ríos J. L. (1997). Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *European Journal of Pharmacology*, **334**, 103-105.
- Min W.- L., Jung H.- K., Dong W.- J. Kyoung H.- A., Sang H.- T., Young J.- S. (2000). Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by diarylheptanoid from the bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **23**, 517-518.
- Mitscher L. A., Drake S., Gollapudi S. R., Okwute S. K. (1987). A modern look at the folkloric use of anti-infective agents. *Journal of Natural Products*, **50**, 1025-1040.
- Nobuko S., Yoshikatsu Y., Takao I. (1987). Triterpenoids from *Myrica rubra*. *Phytochemistry*, **26**, 217-219.



- Palacios E. J. F. (2004). Compuestos biodinámicos de las especies *Larrea divaricata* Cov. (Zygophyllaceae) y *Phoradendron robinsonii* Urban (Loranthaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Peres V., Tanus J., Faustino de Oliveira F. (2000). Tetraoxygenated naturally occurring xanthones. *Phytochemistry*, **55**, 683-710.
- Ríos J. L., Recio M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 80-84.
- Rodd's Chemistry of Carbon Compounds (1969). Elsevier Publishing. 2ª Edición, 1969, Holanda, Vol. II, Parte C. pp 406-460.
- Roveló M. A. R. (2002). Estudio de la interacción sinérgica de *Phytolacca americana* L. y *Alnus acuminata* sbsp. *arguta* (Schlecht) Furlow como agentes antiinflamatorios en rata Wistar. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México
- Salama A. M., Rincon J., Torres M. A., Iregui C. (1997). Efecto abortivo, aislamiento e identificación de principios activos de *Alnus acuminata*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, **25**, 36-38.
- Salama A. S., Yamile I. A. (2005). Actividad antiinflamatoria de δ -amirona y 4',7'-dimetoxiapigenina aislados de *Alnus acuminata*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, **34**, 117-121.
- Santamour F., Lundgren L. (1997). Rhododendrin in *Betula*: a reappraisal. *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**, 335-341.



- Steele C. P., Warhurst D. C., Kirby G., Simmonds M. (1999). *In vitro* and *in vivo*, evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytotherapy Research*, **13**, 115-119.
- Tori M., Kasushi H., Yoshinori A. (1995). Diarylheptanoids, flavonoids, stilbenoids, sesquiterpenoids and phenanthrene from *Alnus maximowiczii*. *Phytochemistry*, **40**, 1263-1264.
- Uddin A.V., ur-Rahman, A. (1994). Handbook of Natural Products. Elsevier, 1^a Edición, Amsterdam, Holanda, Vol. 2. pp 533-534, 1027-1031, 1064-1079, 1549-1556.
- Villareal M. L., Álvarez L., Alonso D., Navarro V., García P., Delgado G. (1994). Cytotoxic and antimicrobial screening of selected triterpenoids from Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*, **42**, 25-29.
- Yamaguchi K. (1970). Spectral data of natural products. Elsevier, Holanda, Vol. 1. pp 132-151.
- Yu Y., Miyashiro H., Nakamura N., Hattori M., Park J. C. (2007). Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from *Alnus firma* on HIV-1 viral enzymes. *Archives of Pharmaceutical Research*, **30**, 820-826.
- Comisión de Educación Superior de Pakistán:
<http://pr.hec.gov.pk/Chapters/647-3.pdf>
- Comisión Nacional Forestal, México:
<http://www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/bosquedes/Fichas%20Técnicas/Alnus%20acuminata.pdf>



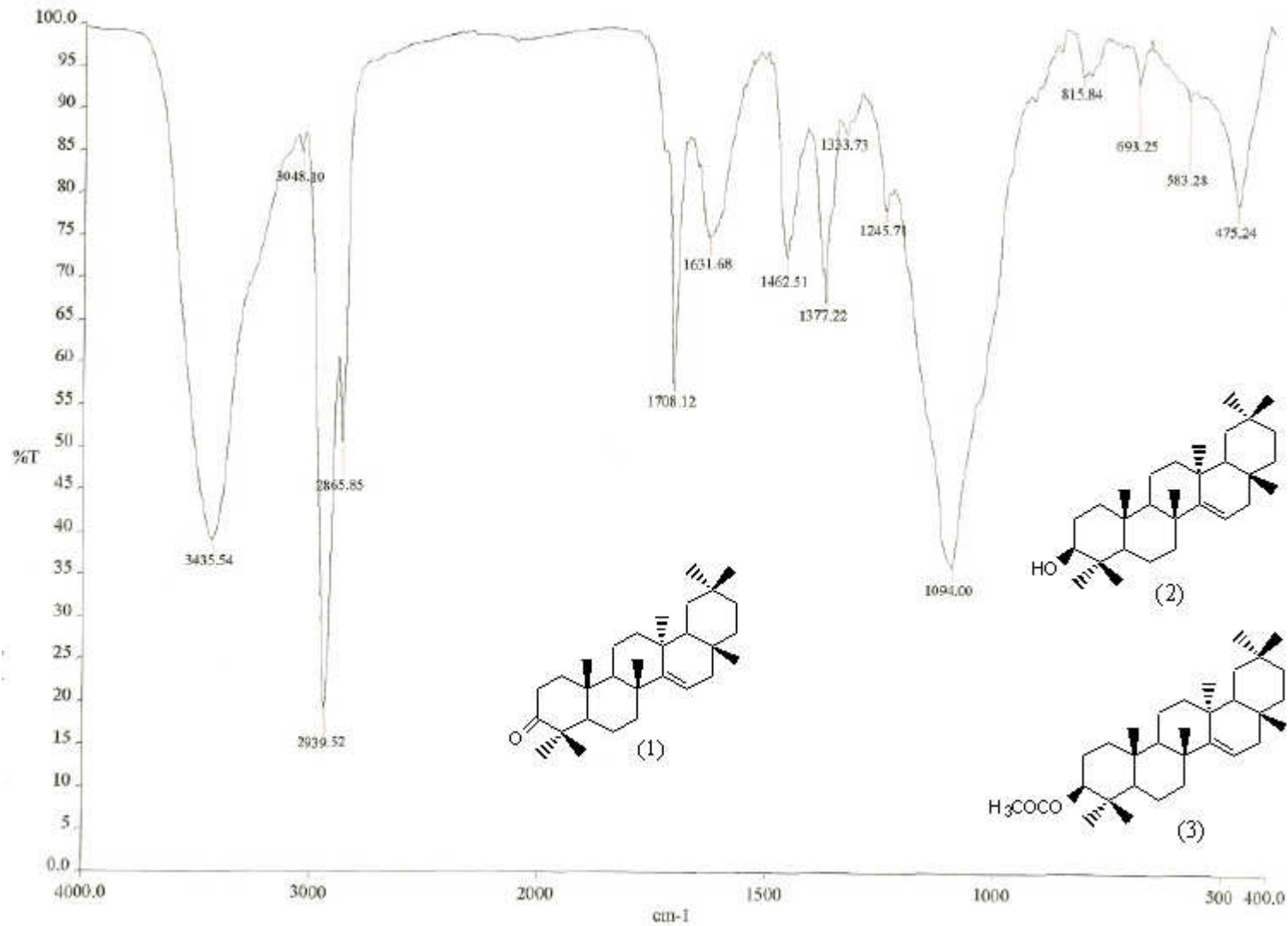
- Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, México:
http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/9-betul1m.pdf

- Herbarium de la Universidad de Oxford, Departamento de Ciencias Botánicas, Universidad de Oxford, Inglaterra:
http://herbaria.plants.ox.ac.uk/adc/downloads/capitulos_especies_y_anexos/alnus_acuminata.pdf

- Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México
<http://www.arboles.org>

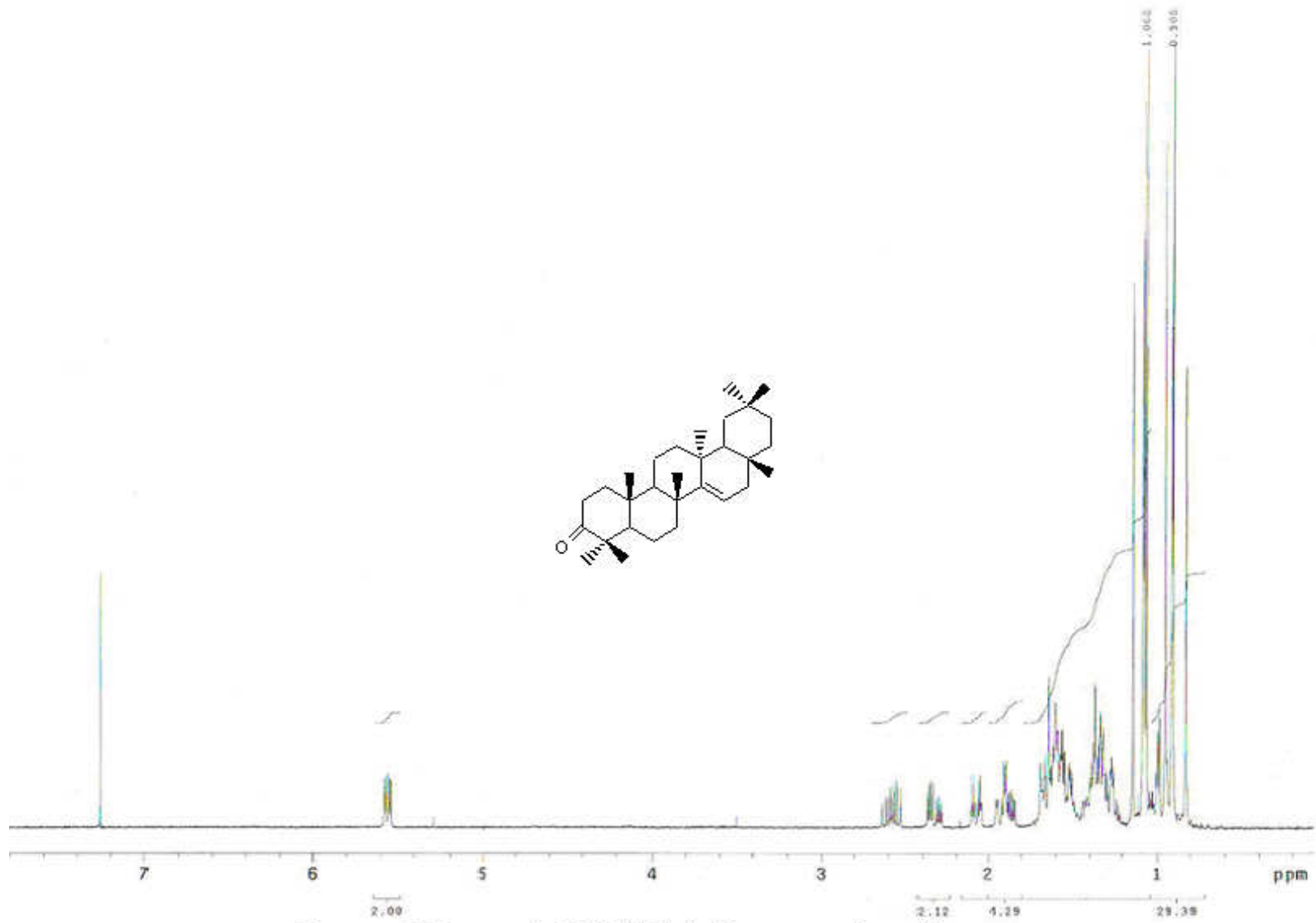
- Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica:
<http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=2137&-Find>

- Wikipedia Foundation Incorporation:
http://es.wikipedia.org/wiki/Alnus_acuminata



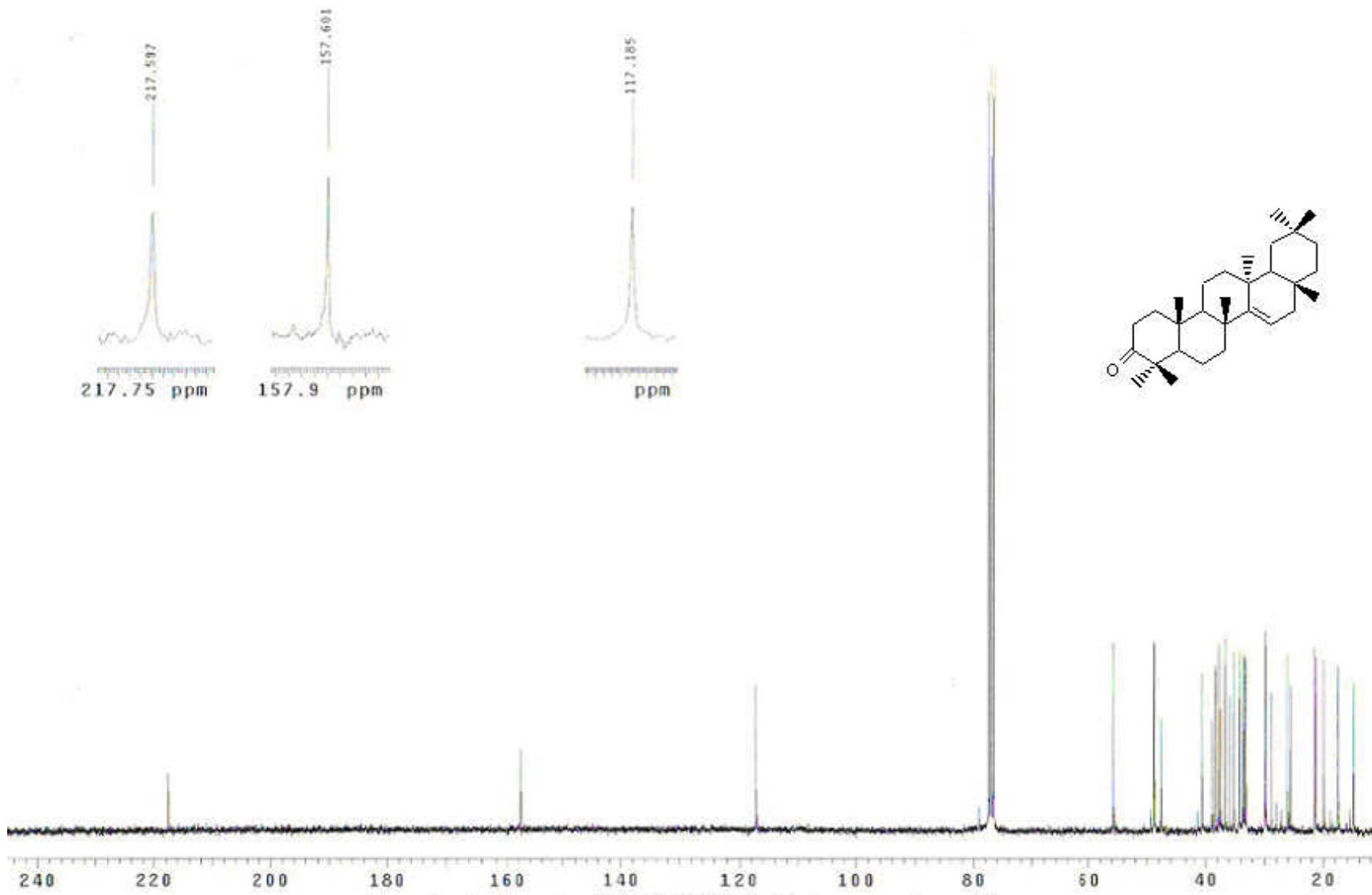
Espectro 1. Espectro en el IR de la fracción 16 (compuestos 1, 2 y 3)





Espectro 2. Espectro de RMN ^1H de la 14-taraxeren-3-ona (1)





Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C de la 14-taraxeren-3-ona (1)



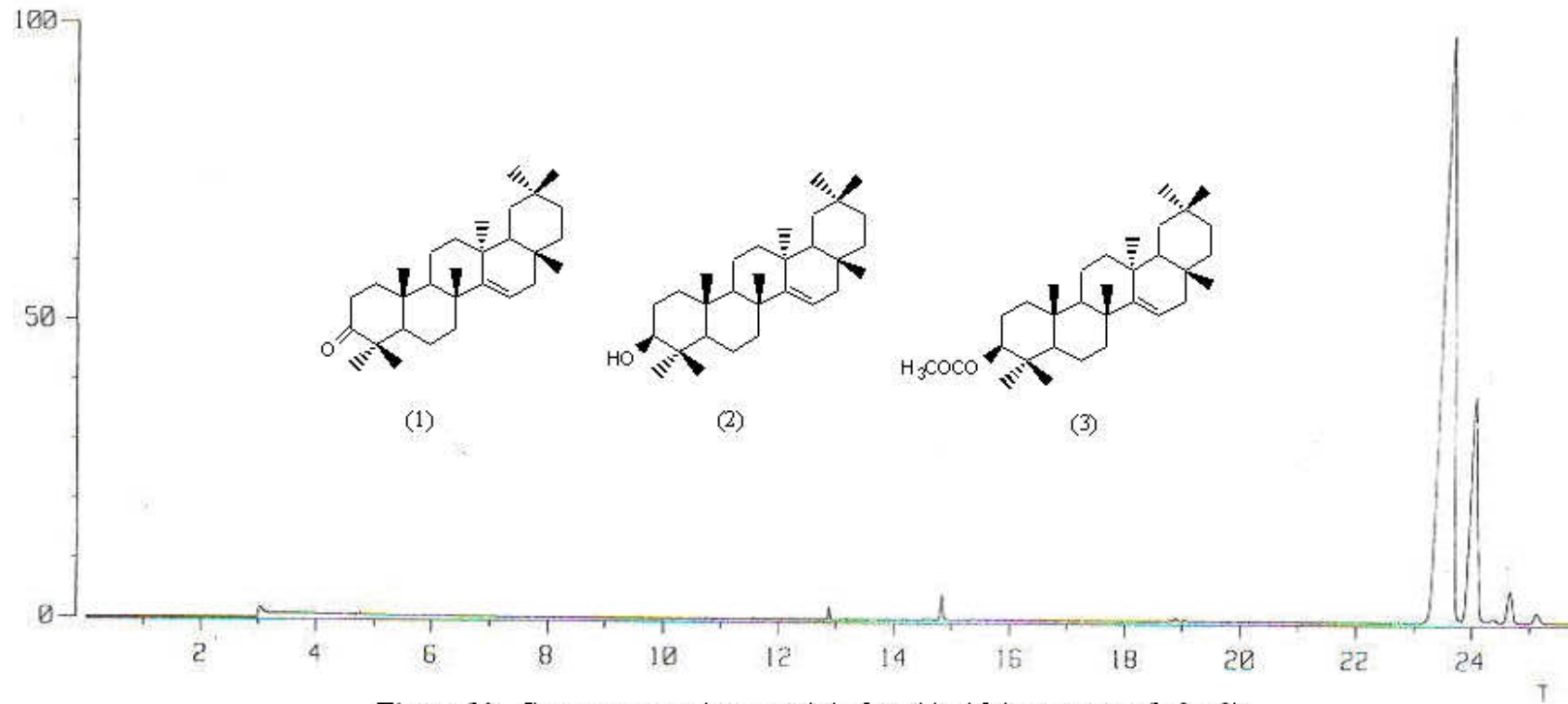
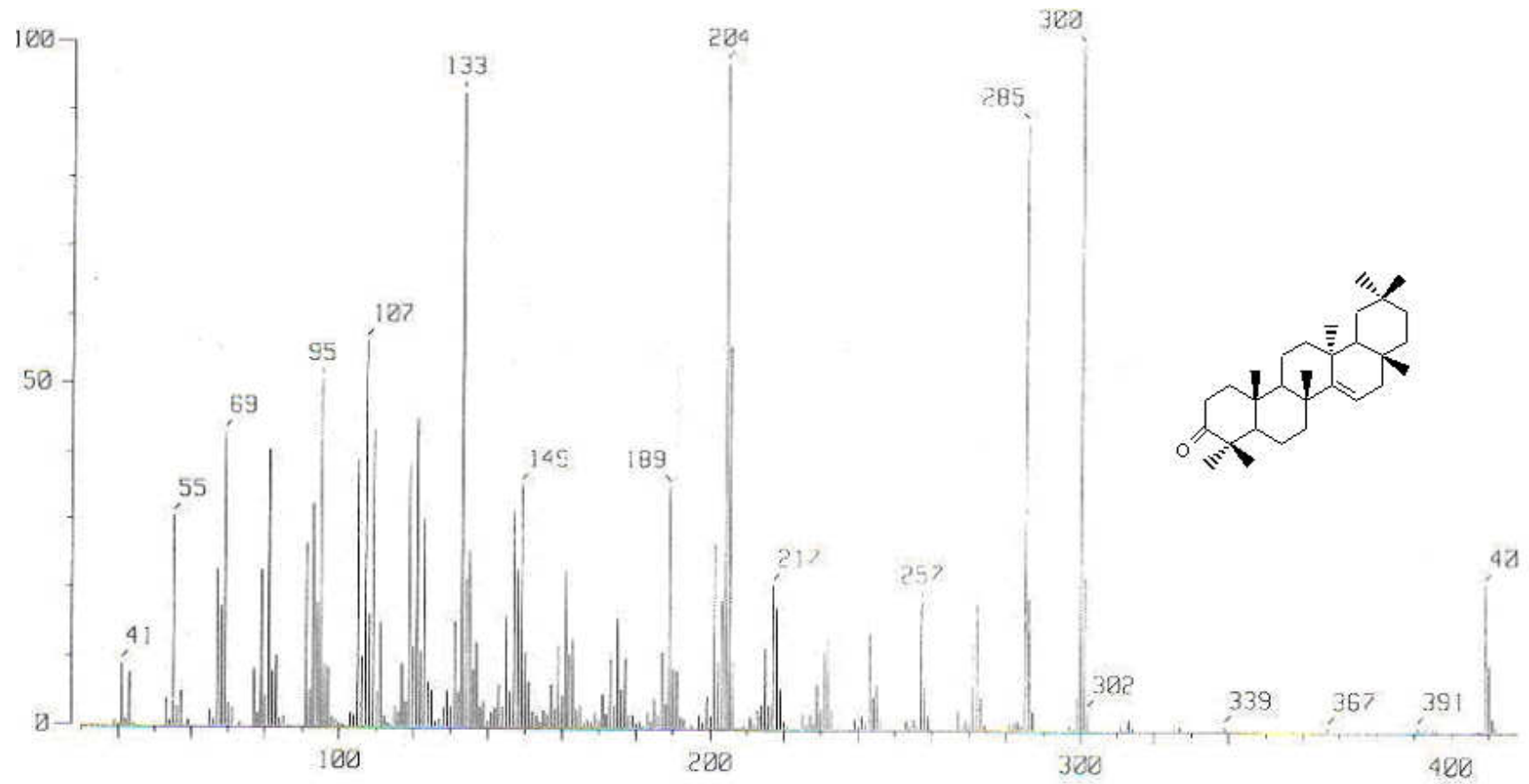


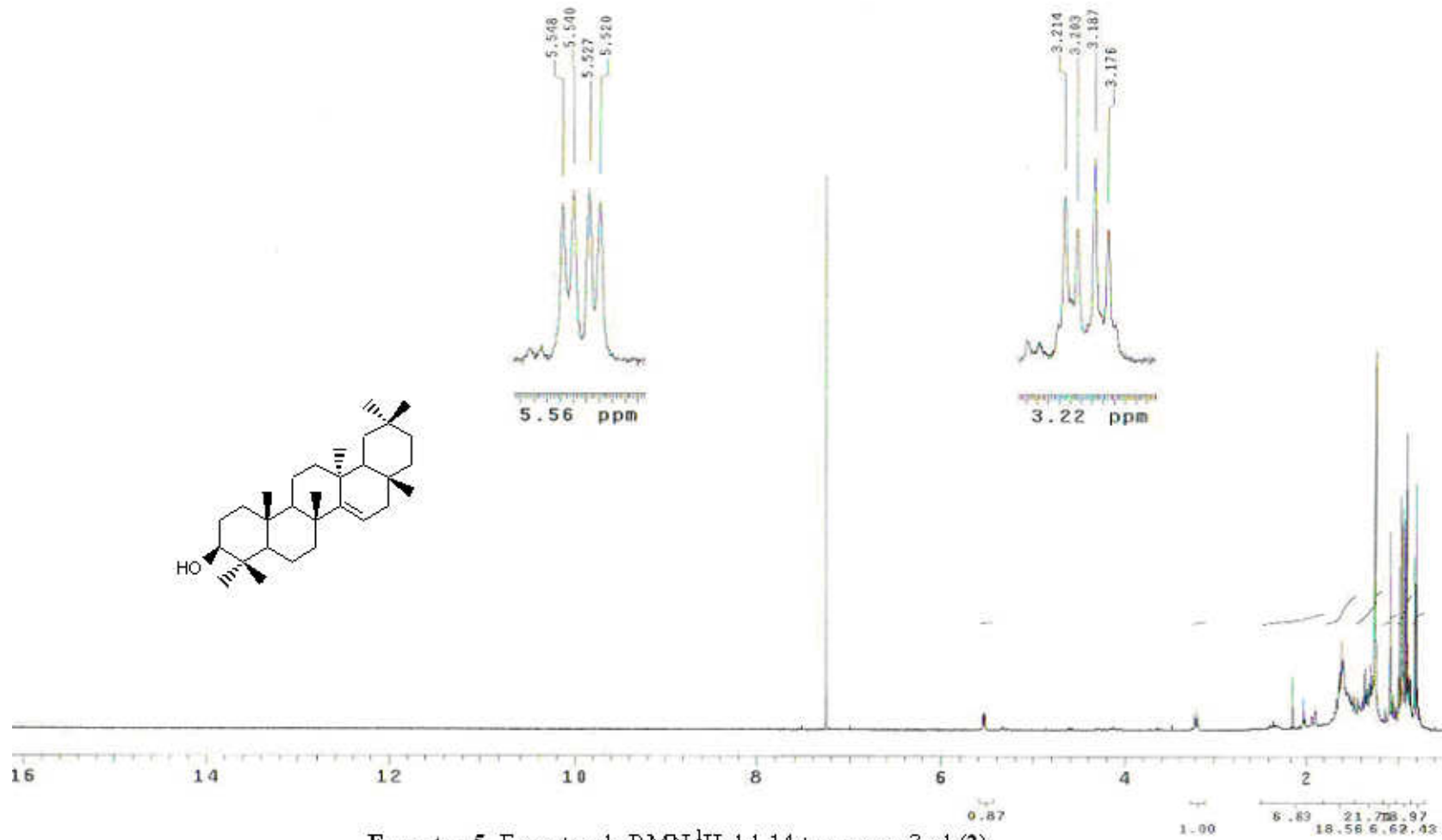
Figura 19 . Cromatograma de gases de la fracción 16 (compuestos 1, 2 y 3)





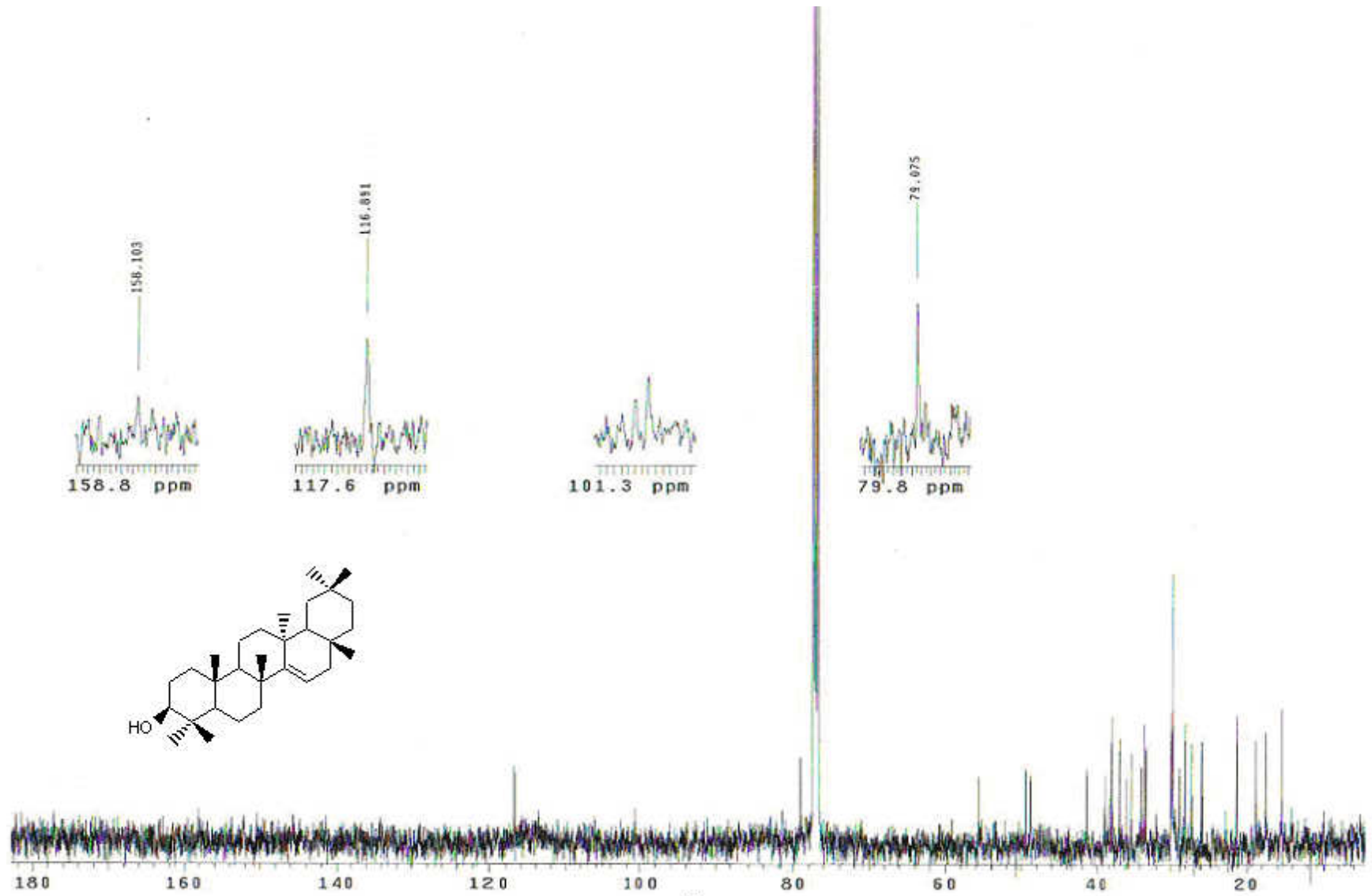
Espectro 4. Espectro de masas de la 14-taraxeren-3-ona (I)





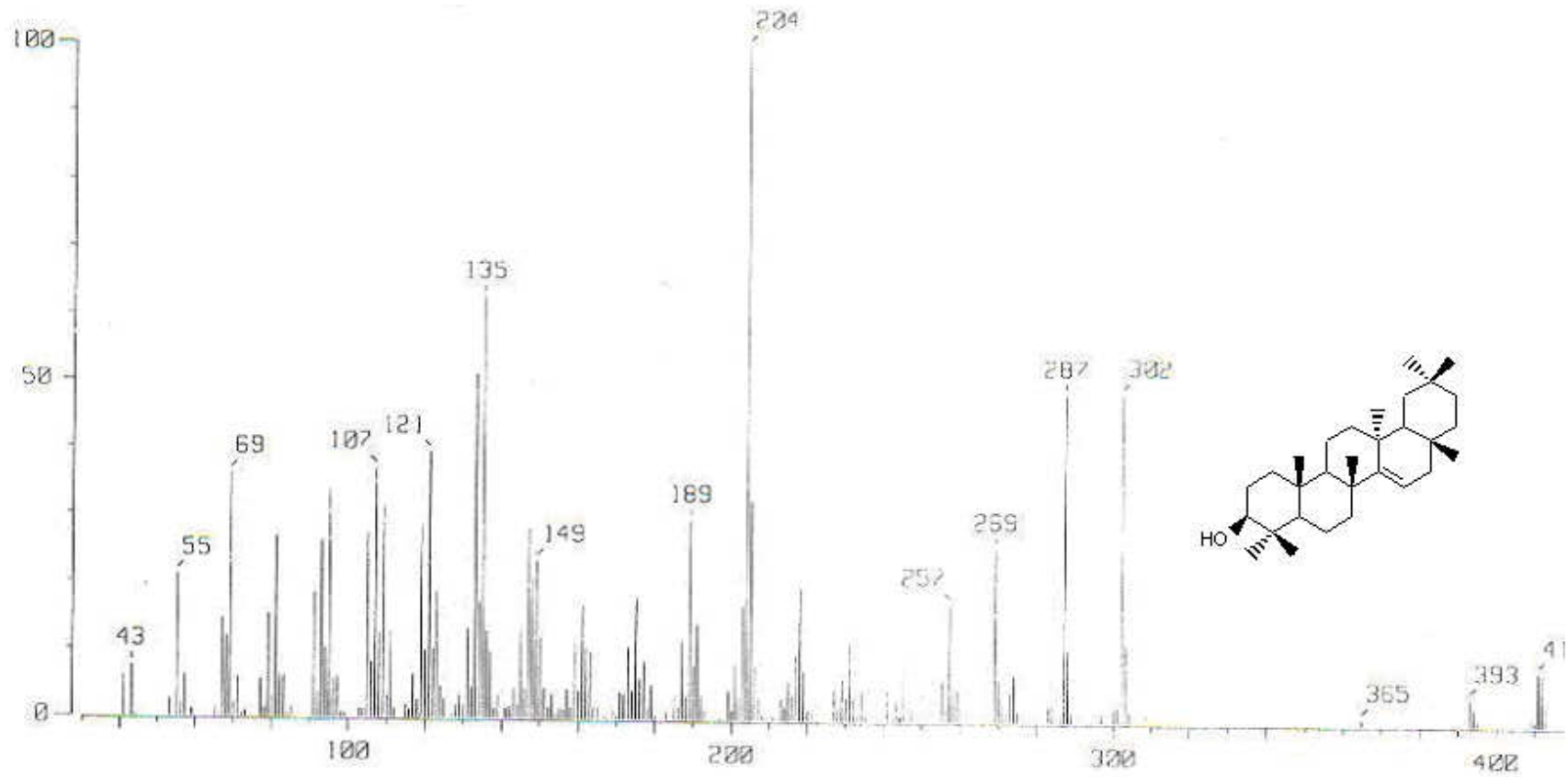
Espectro 5. Espectro de RMN¹H del 14-taraxeren-3-ol (2)





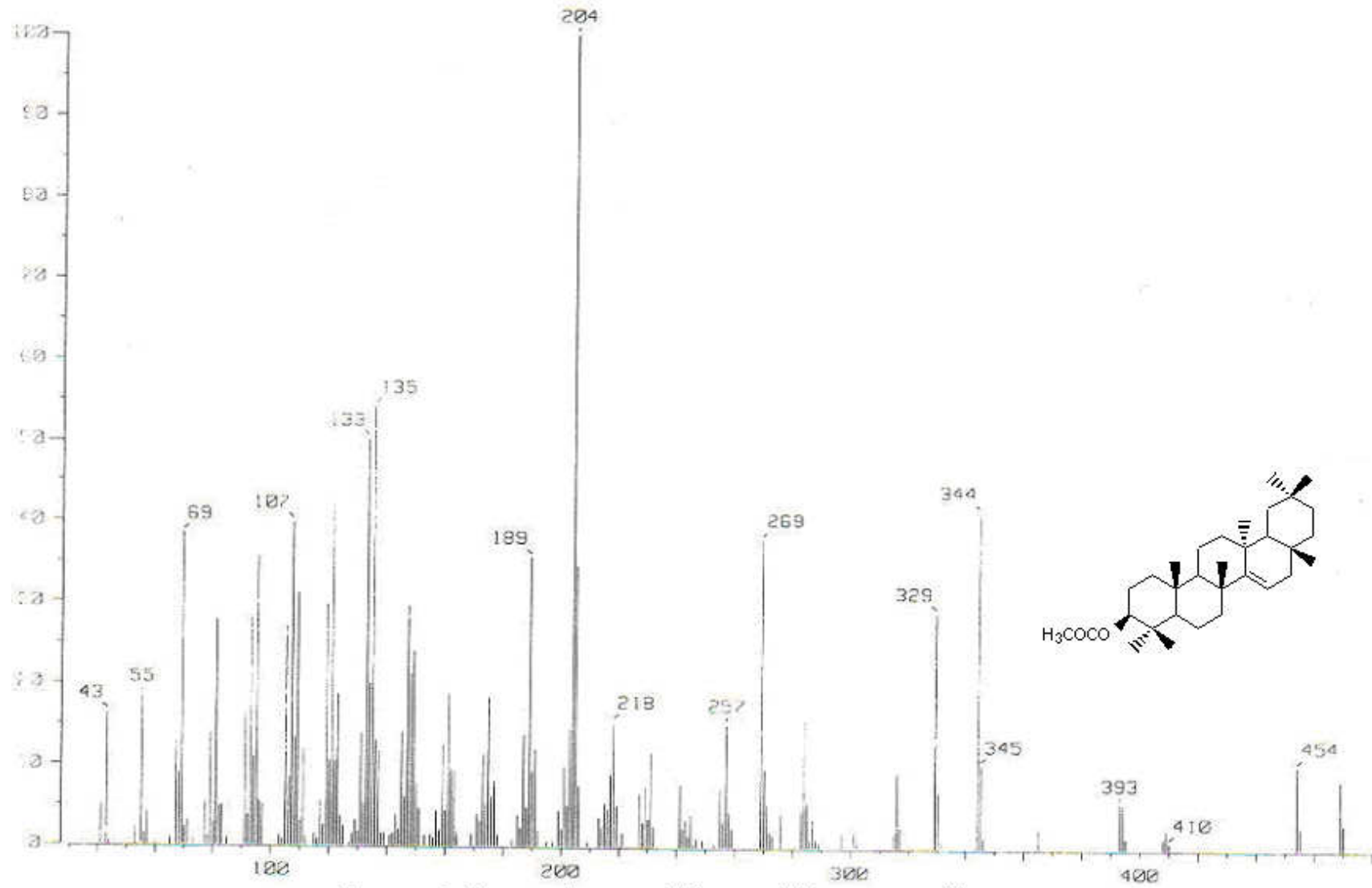
Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C del 14-taraxeren-3-ol (2)





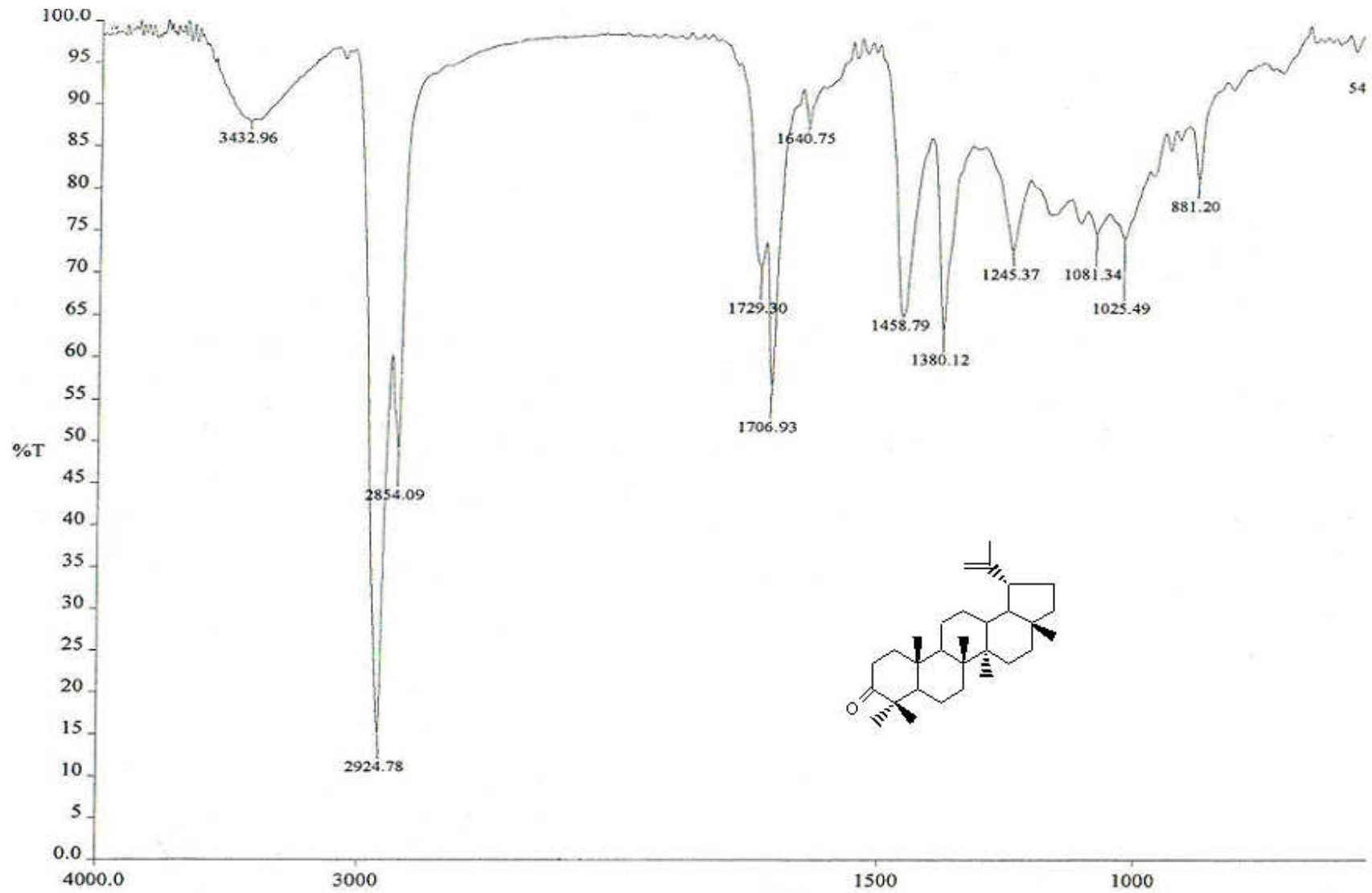
Espectro 7. Espectro de masas del 14-taraxeren-3-ol (2)





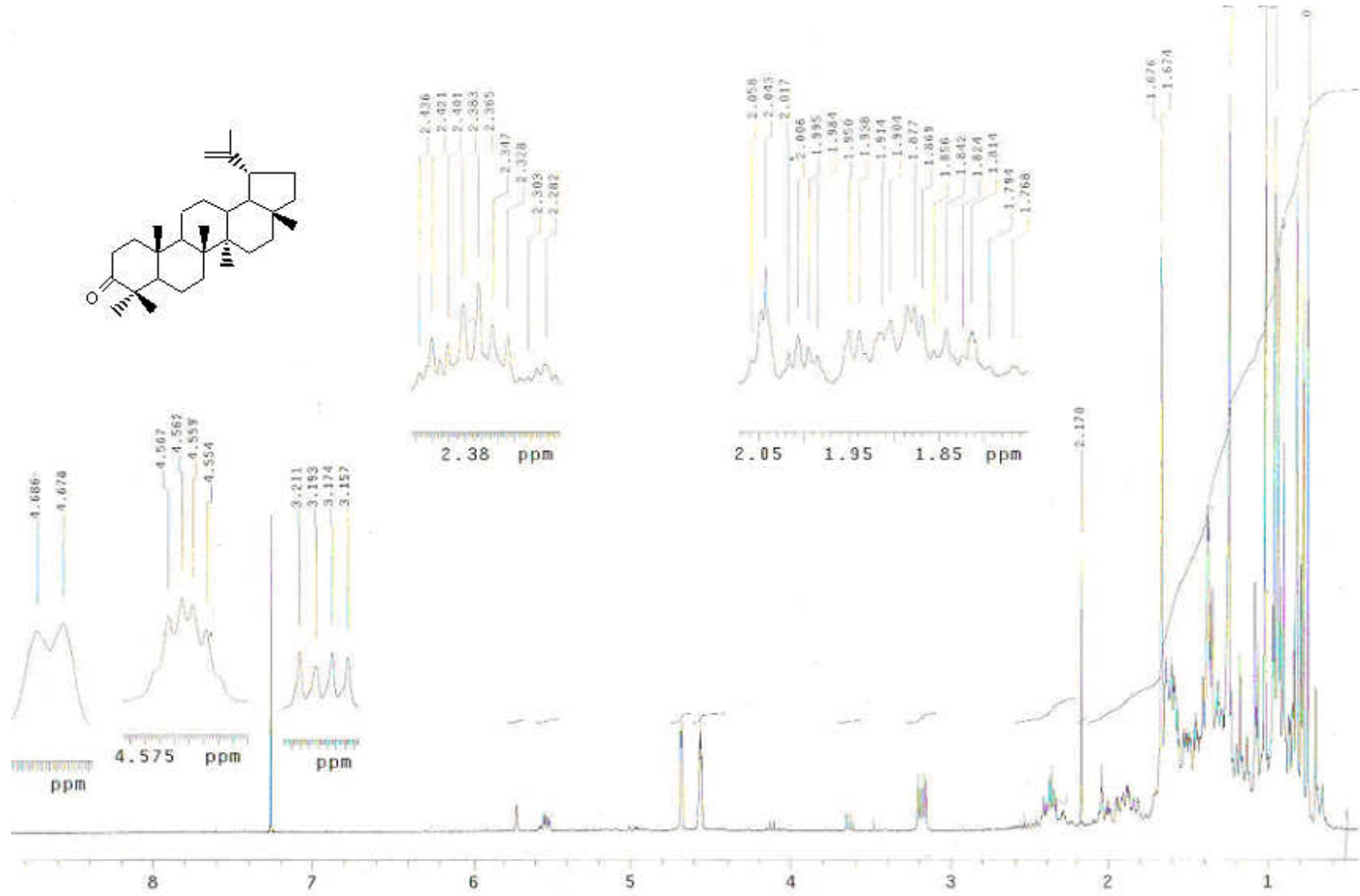
Espectro 8. Espectro de masas del 3-acetoxi-14-taraxereno (3)





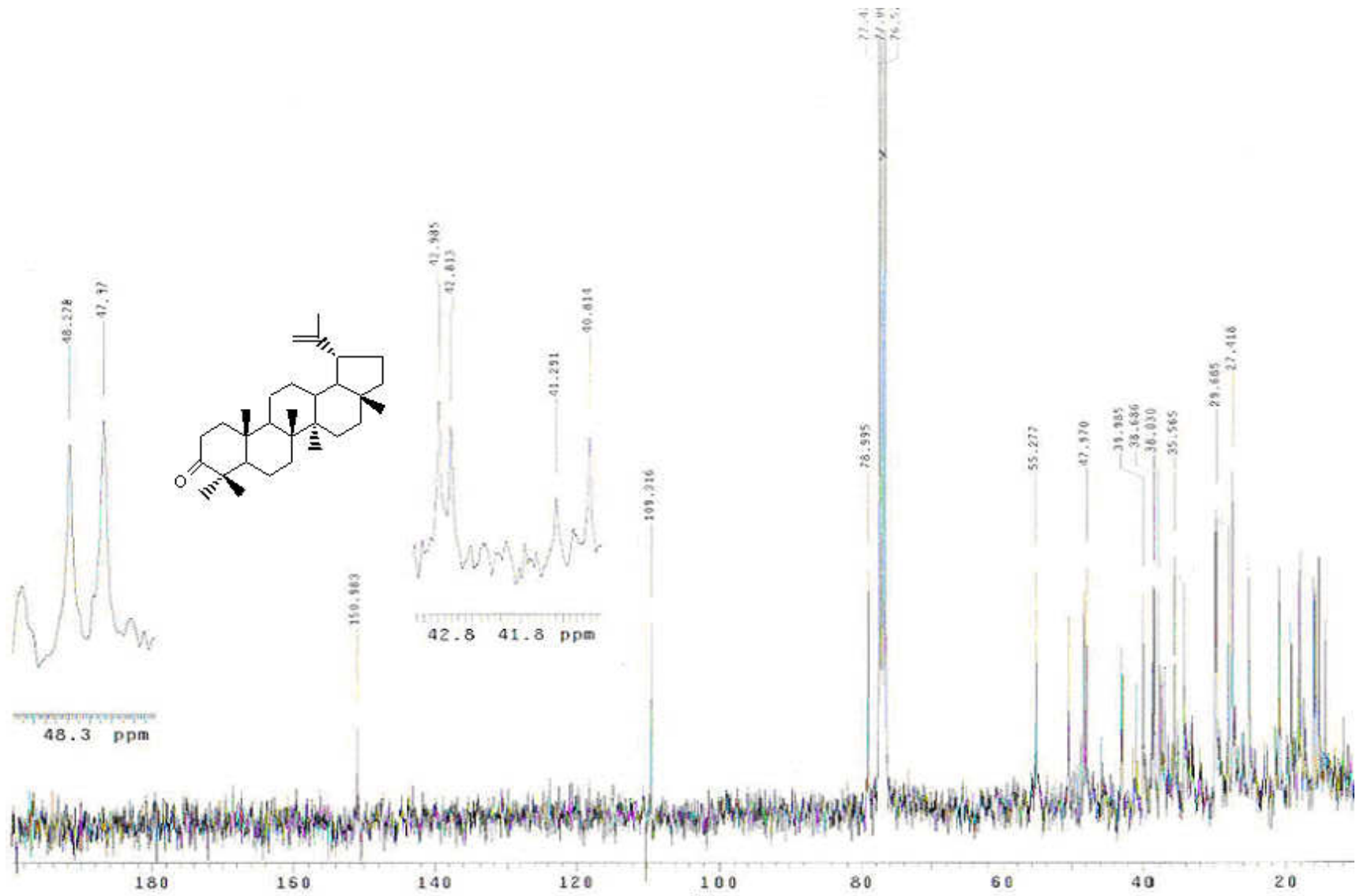
Espectro 9. Espectro en el IR del 3-oxo-lup-20(29)-eno (4)





Espetro 10. Espetro de RMN ^1H de la 3-oxo-lup-20(29)-eno (4)





Espectro 11. Espectro de RMN¹³C del 3-oxo-lup-20(29)-eno (4)



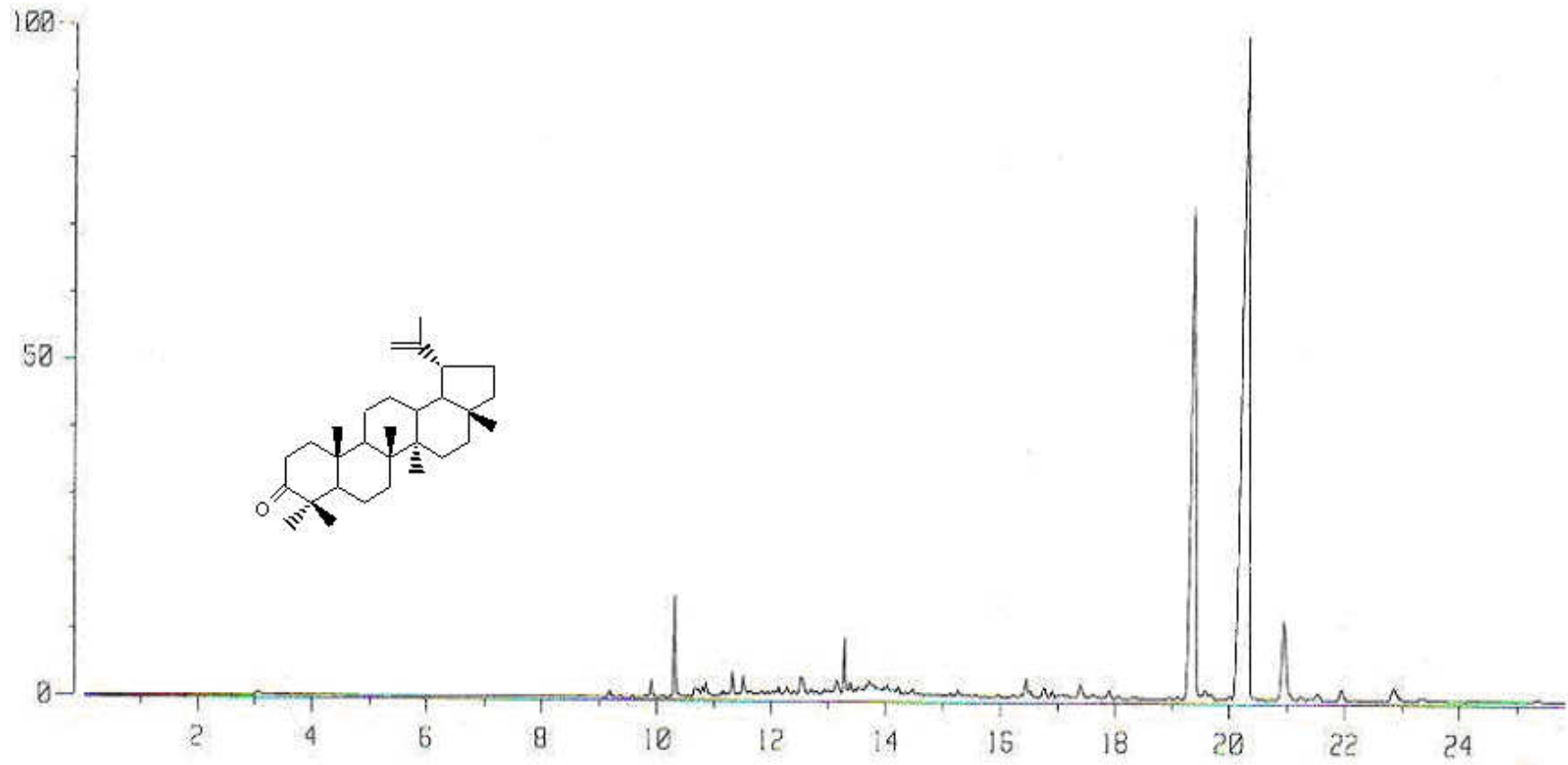
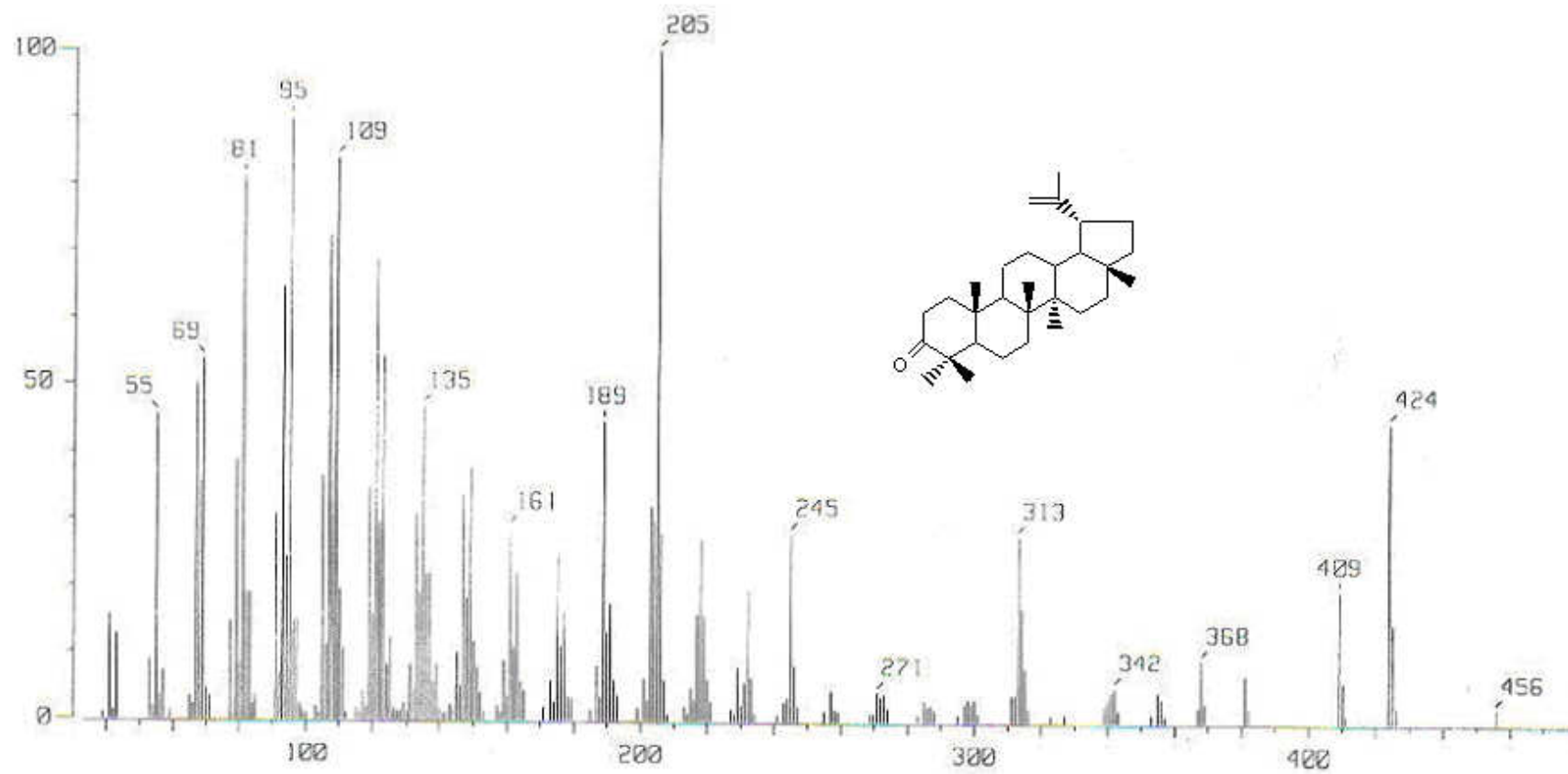


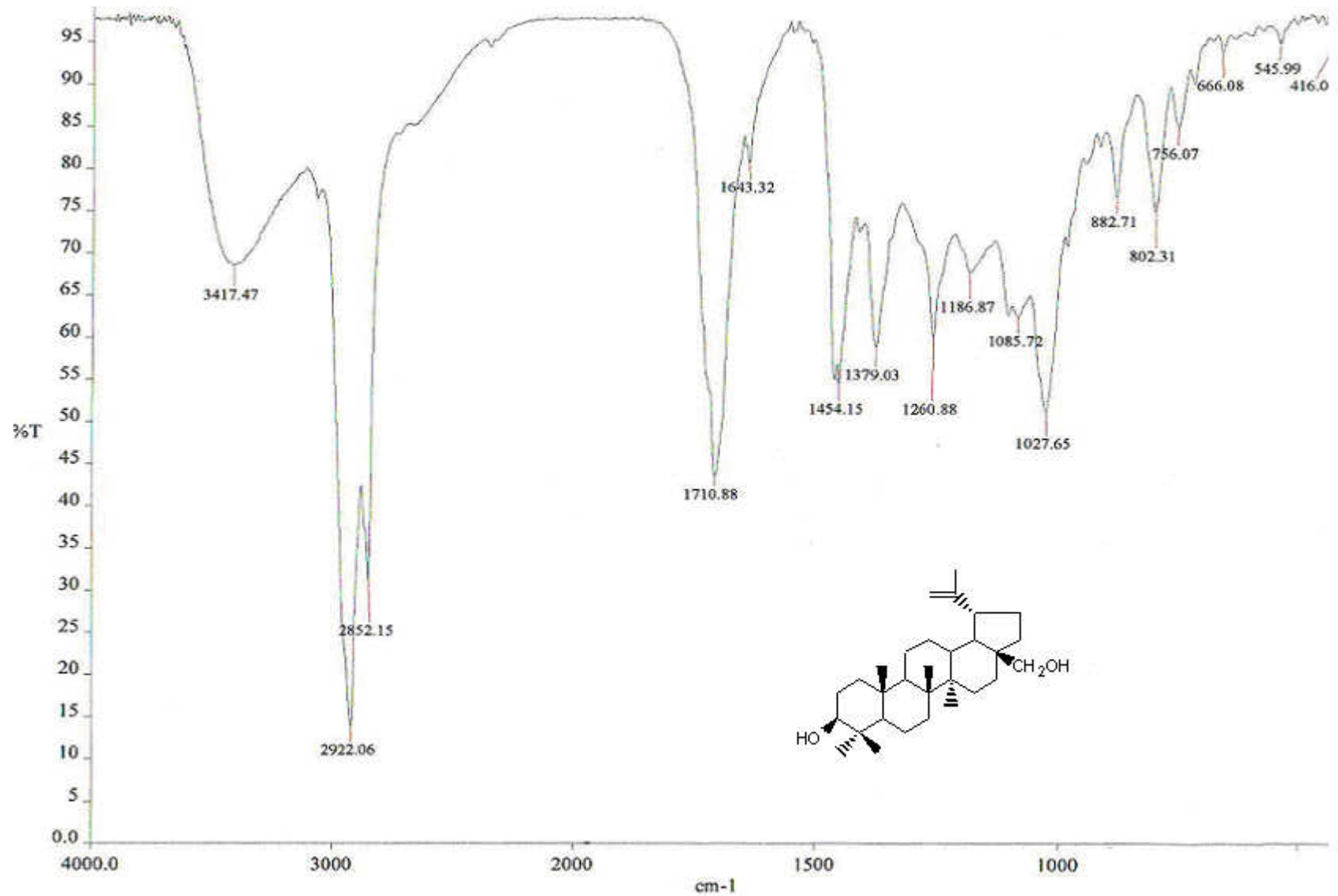
Figura 20. Cromatograma de gases de la fracción 1 (compuesto 4)





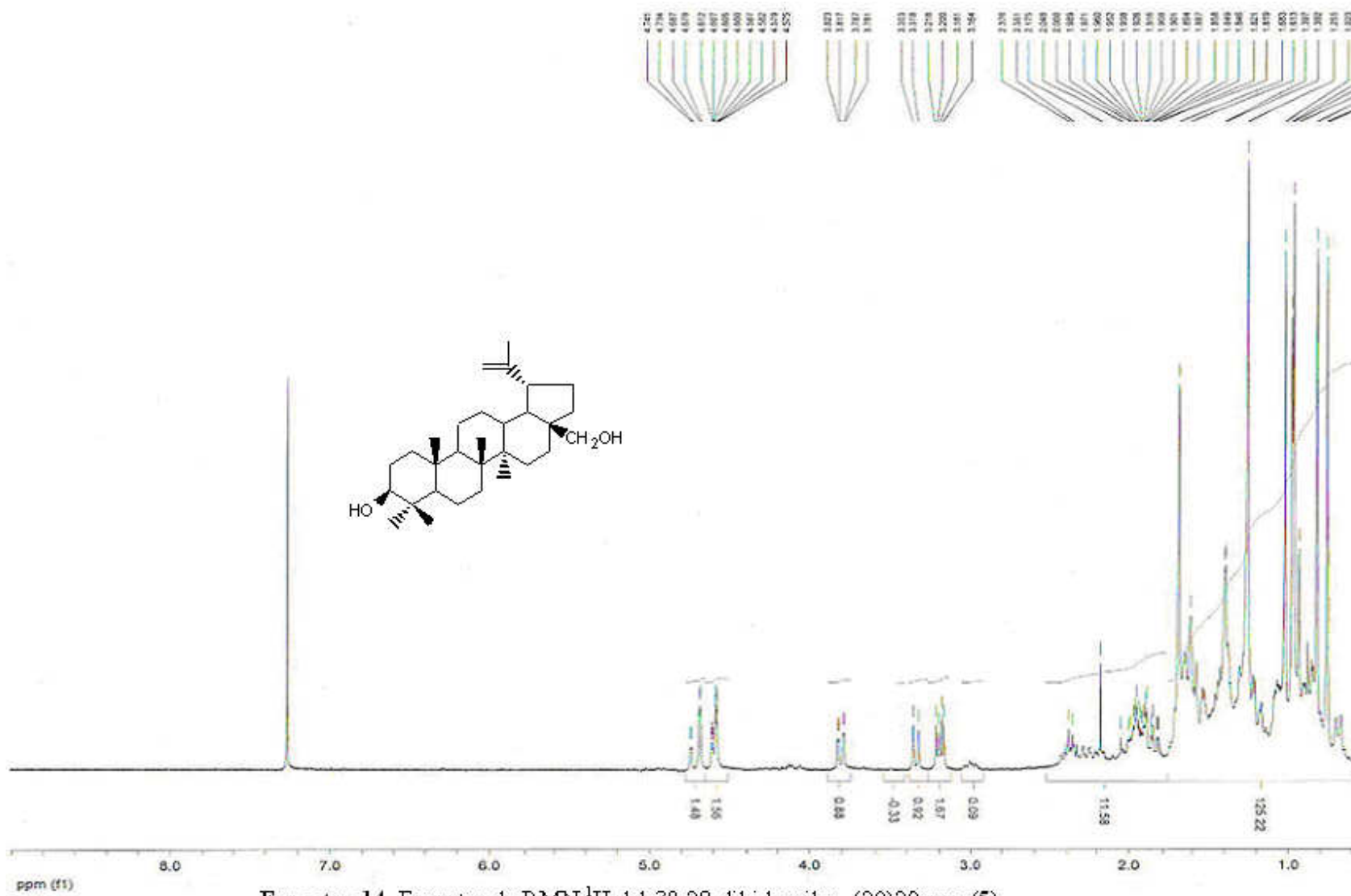
Espectro 12. Espectro de masas del 3-oxo-lup-20(29)-eno (4)





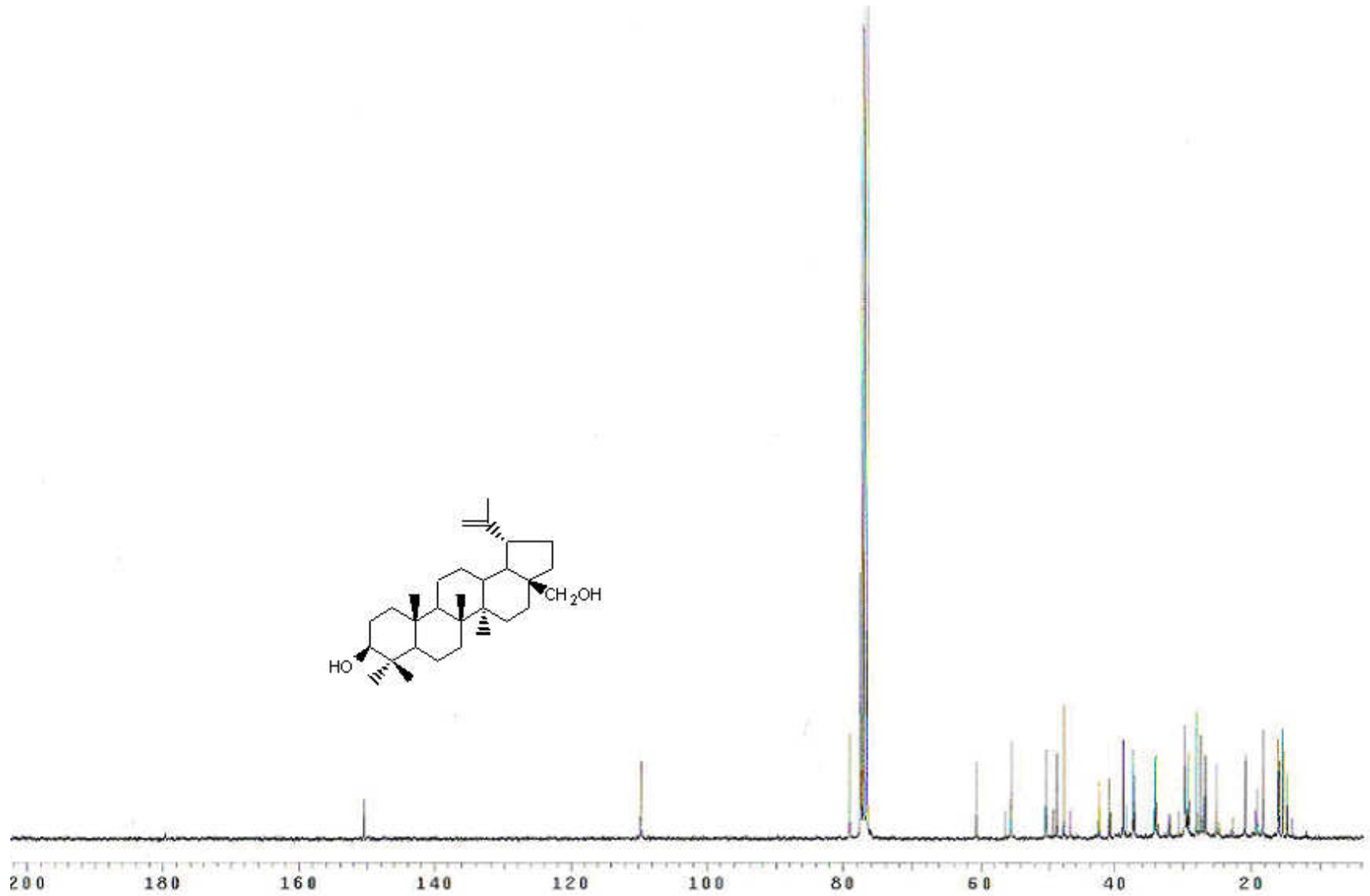
Espectro 13. Espectro en el IR del 3β,28-dihroxilup-(20)29-eno (5)





Espectro 14. Espectro de RMN ^1H del 3 β ,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5)





Espectro 15. Espectro de RMN ¹³C del 3β,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5)



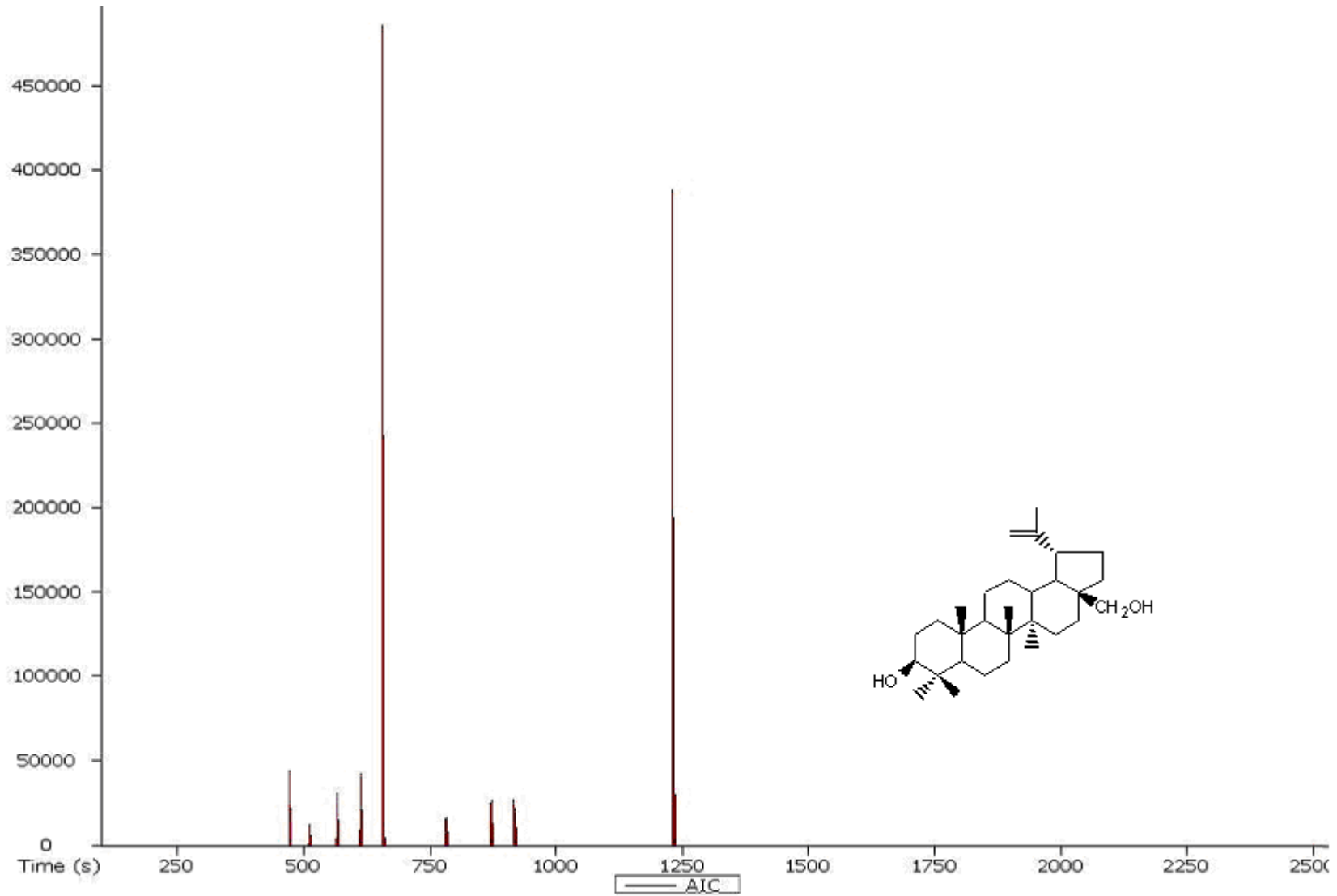
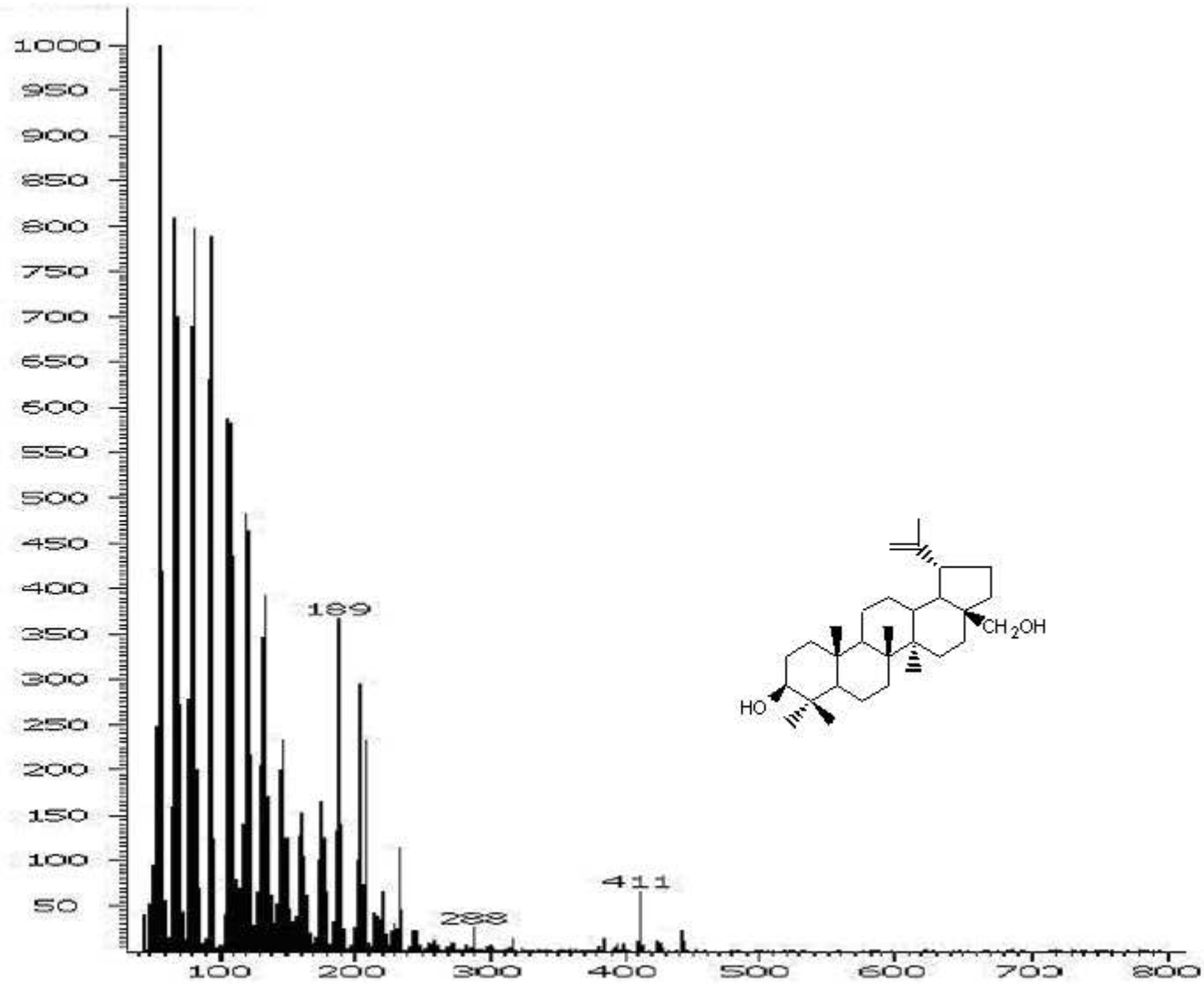


Figura 21. Cromatograma de gases de la fracción 15-18 (compuesto 5)





Espectro 16. Espectro de masas del 3β,28-dihidroxilup-(20)29-eno (5)



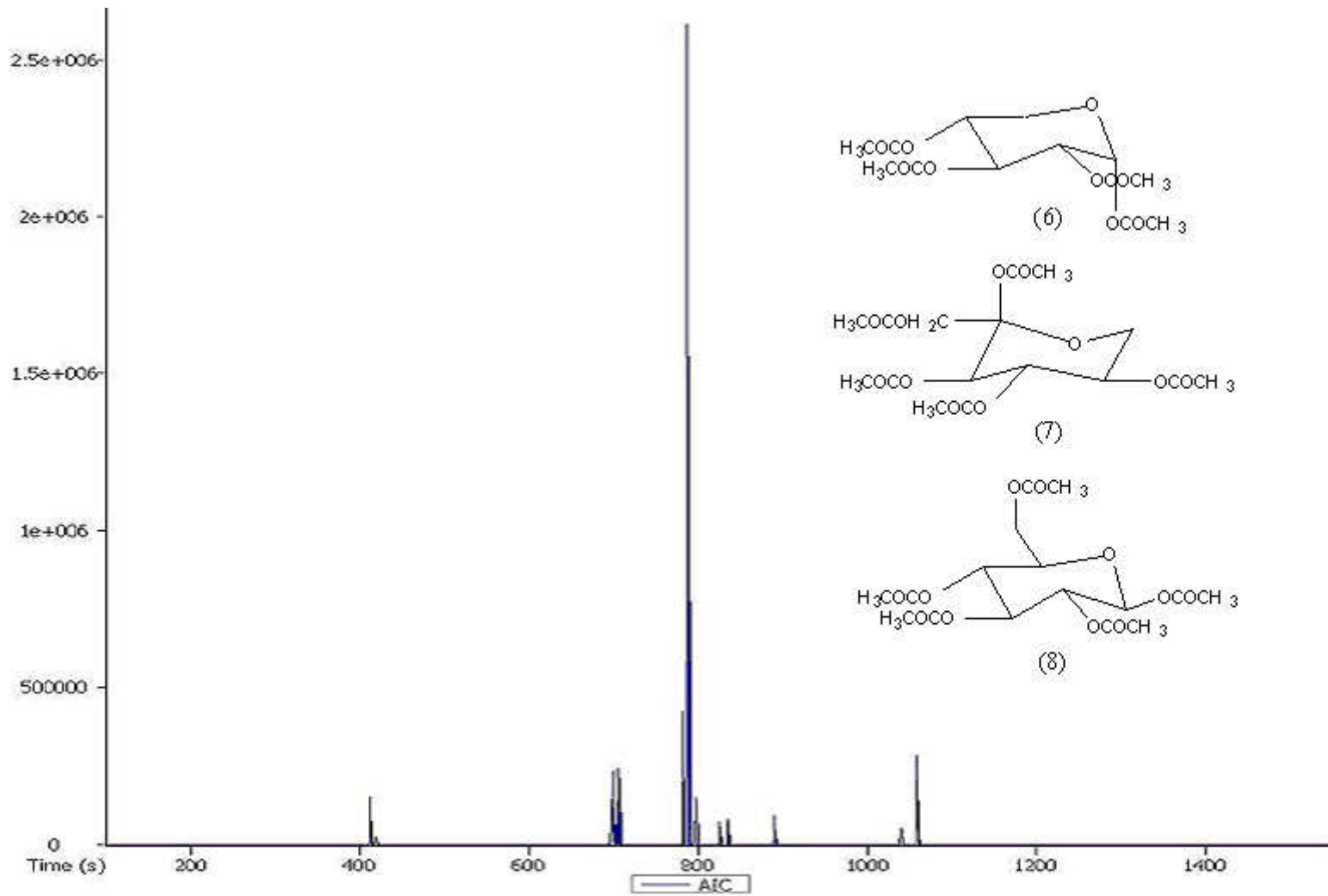
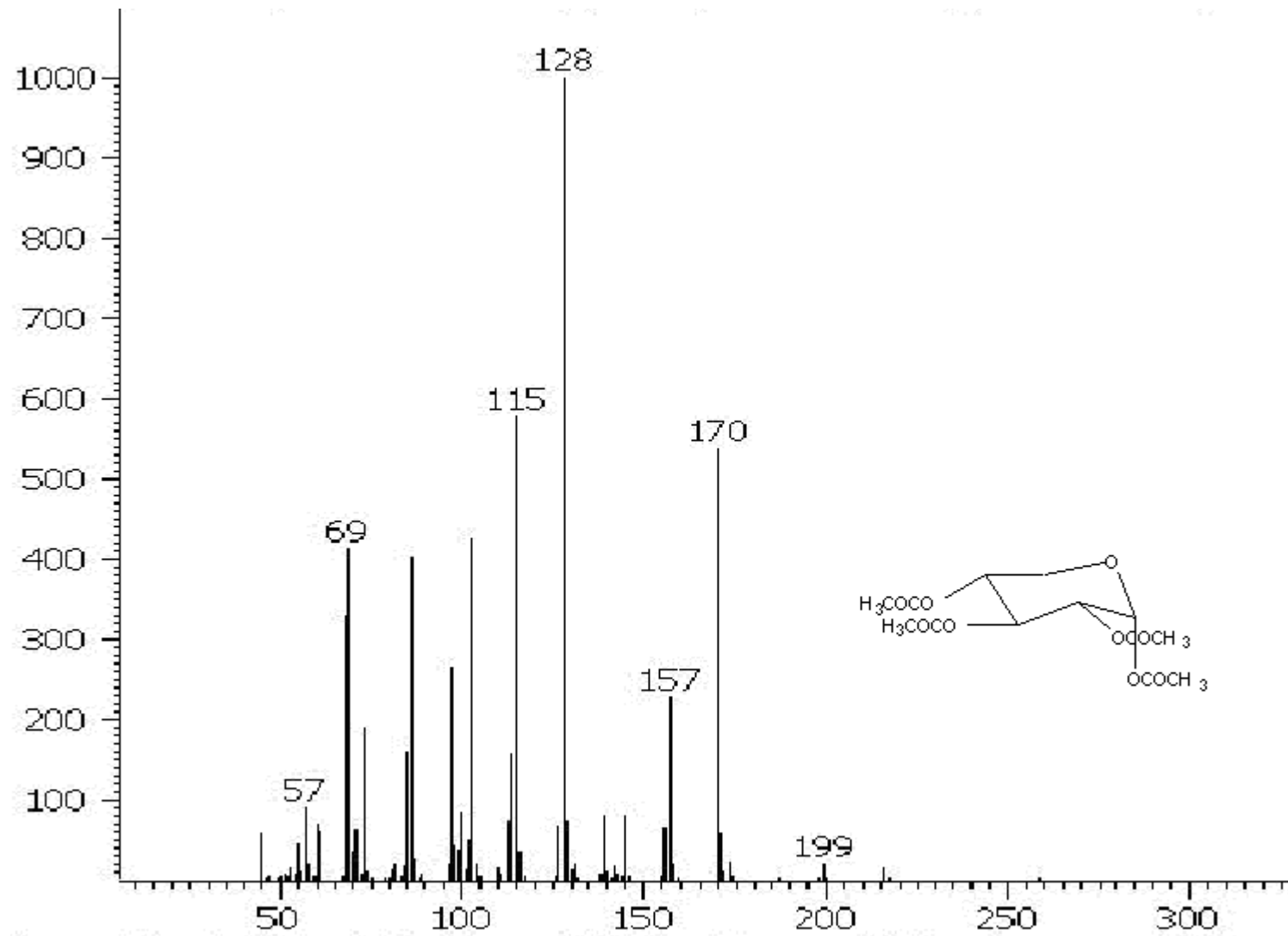


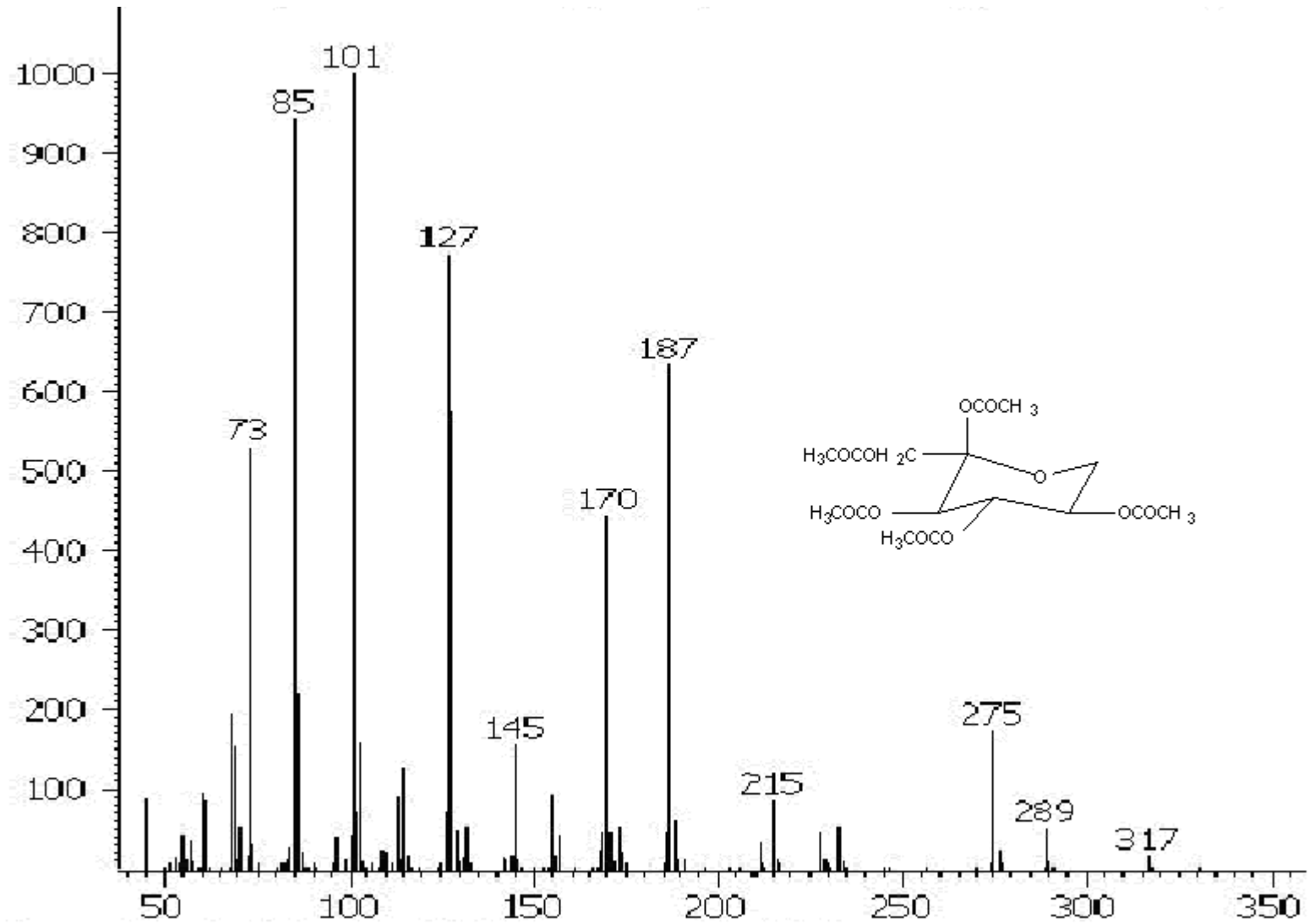
Figura 22. Cromatograma de gases del extracto butanólico acetilado (compuestos 6, 7 y 8).





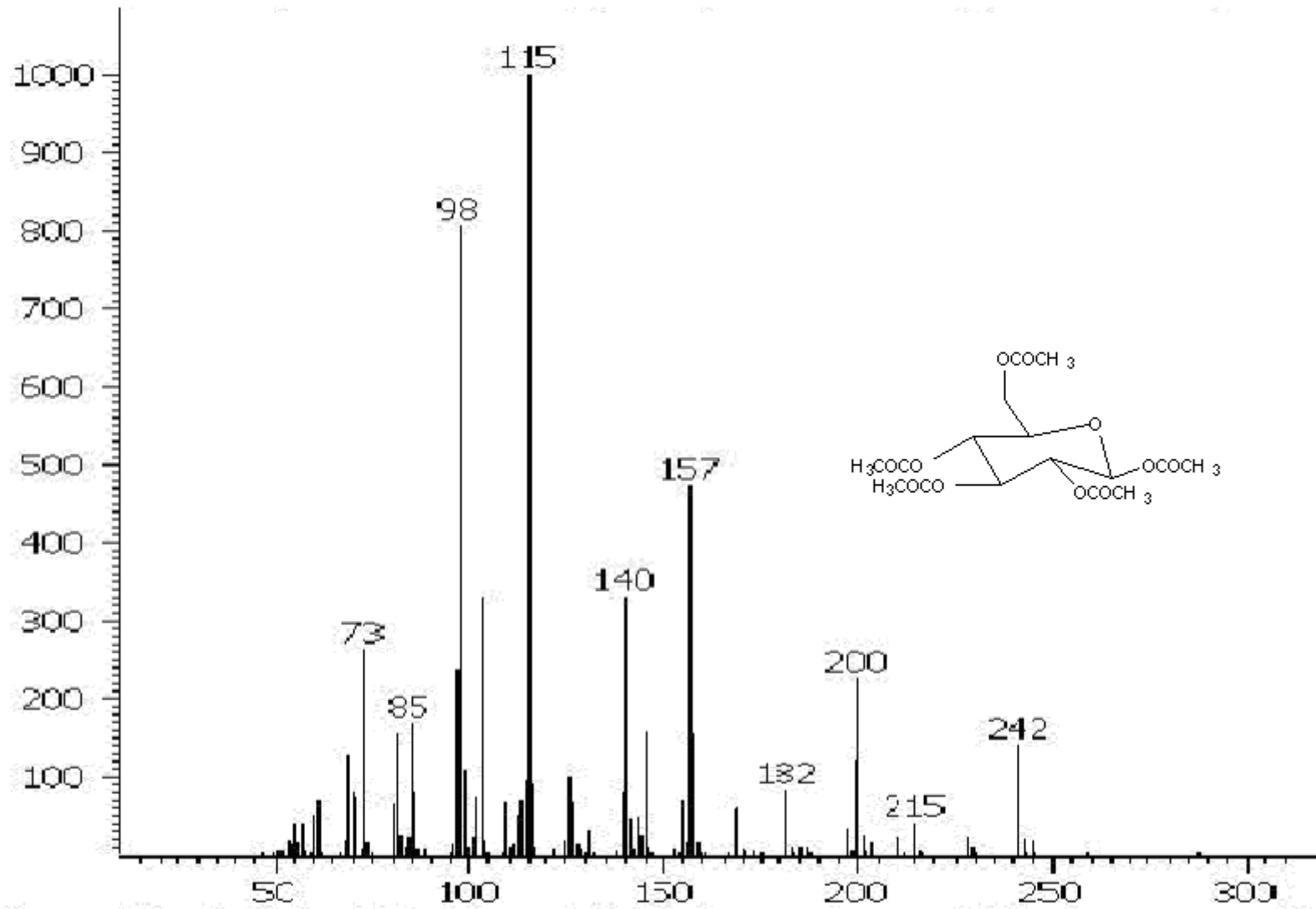
Espectro 17. Espectro de masas del tetraacetil α -D-xilosa (6)





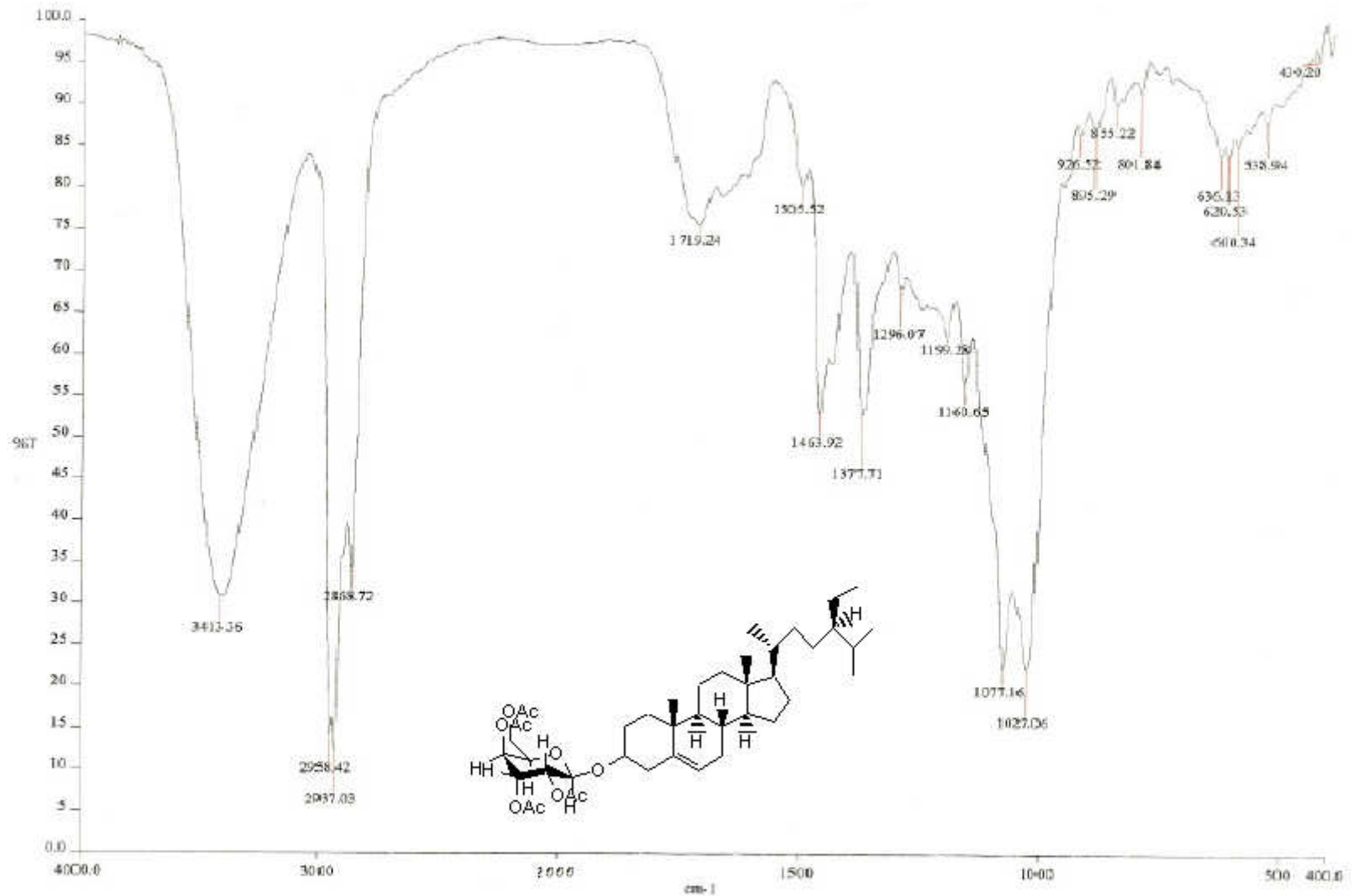
Espectro 18. Espectro de masas del pentaacetil D-fructosa (7)





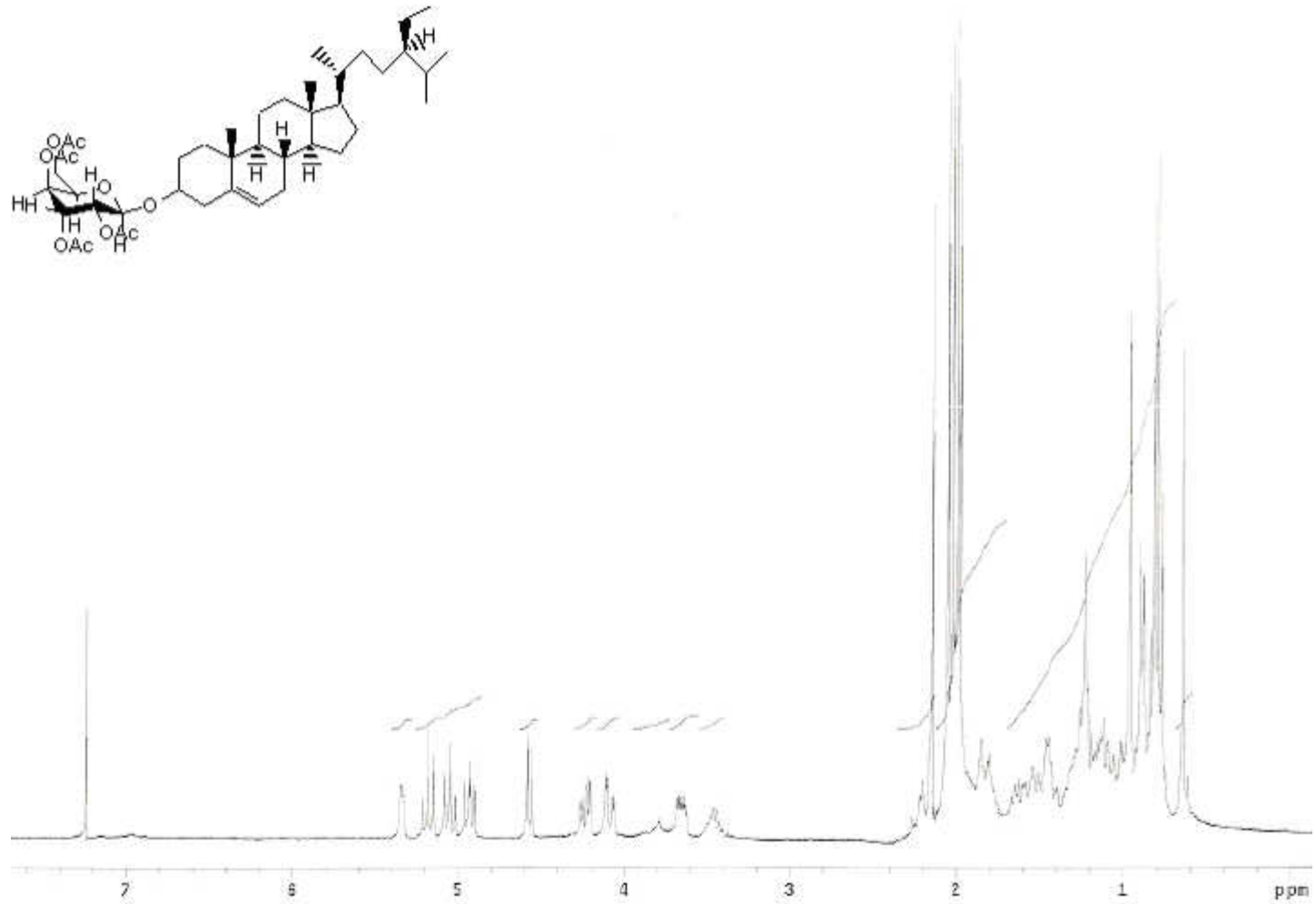
Espectro 19. Espectro de masas del penta-*O*-acetil α -D-glucopiranososa (8)





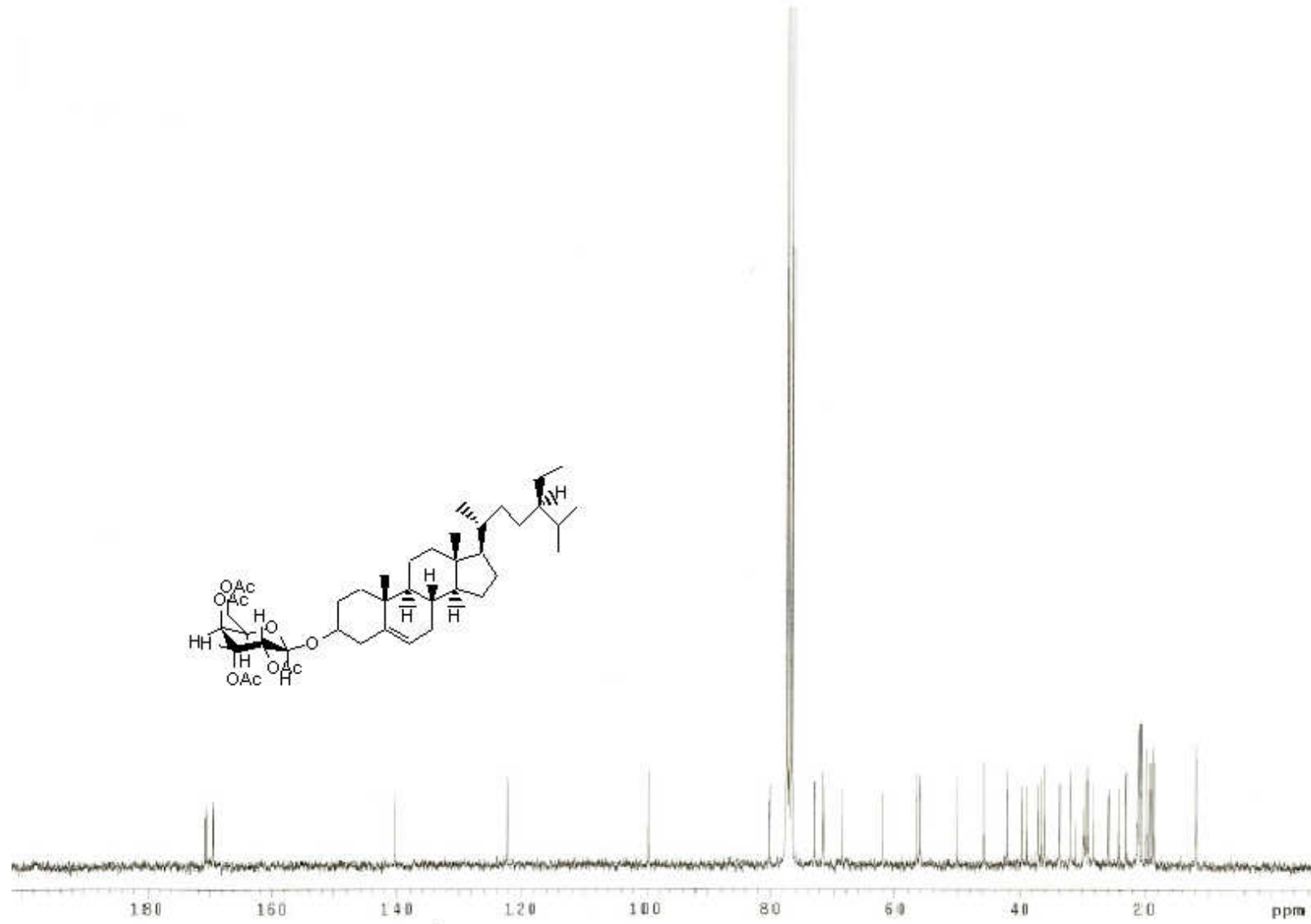
Espectro 20. Espectro en el IR del 2',3',4',6'-O-acetil-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (9)





Espectro 21. Espectro de RMN ¹H del 2',3',4',6'-O-acetil-β-D -glucopiranosido de β-sitosterilo (9)





Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C del 2',3',4',6'-O-acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (9)

